

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**“Evaluación de la diversidad genética de tres poblaciones de *Caesalpinia Spinosa* procedentes de Cajamarca, Junín y Ayacucho mediante marcadores morfométricos de frutos y marcadores moleculares RAPD”**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo**

**AUTOR**

**César Diego Orihuela Tacuri**

**Lima – Perú**

**2014**



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRES  
POBLACIONES DE *Caesalpinia spinosa* PROCEDENTES DE  
CAJAMARCA, JUNÍN Y AYACUCHO MEDIANTE MARCADORES  
MORFOMÉTRICOS DE FRUTOS Y MARCADORES  
MOLECULARES RAPD”**

Tesis para optar al Título Profesional de  
Biólogo Genetista Biotecnólogo

Bach. César Diego Orihuela Tacuri  
Asesor: Blgo. Alberto López Sotomayor

Lima – Perú

2014

A Eva, Enrique, María y Moisés,  
las preciadas raíces de este gran árbol  
llamado familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un infinito agradecimiento a mis padres, Eva y César, ya que sin su apoyo, inspiración y amor no hubiera sido posible el cumplimiento de esta meta, que también es la suya.

Gracias a Isel, Osmar y Gonzalo, mis queridos hermanos, por estar pendientes de mi bienestar y por alentarme a seguir mejorando cada día.

Quiero agradecer también a mi abuela Eva, a mis tías Angélica, Amelia, Gloria, Maruja y Ludy y a mis primos Víctor, Estephanie, Carlos y Wendy por hacerme sentir el calor de hogar y la alegría de tener una gran familia.

A mis maestros Alberto López y María Siles, por transmitirme sus conocimientos que me sirvieron y me servirán de mucho durante mi desarrollo profesional y por sus consejos y enseñanzas de vida, aquellos que solo brindan los verdaderos maestros.

Al Dr. Lenin Maturrano, por permitirme desarrollar parte de esta tesis en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria, y por sus recomendaciones y sugerencias valiosas para poder finalizar con éxito esta investigación.

Al Dr. Manuel Marín por su apoyo en la metodología de colecta y medición de frutos de tara.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo financiero del Vicerrectorado de Investigación y la Facultad de Ciencias Biológicas a través del Fondo de Promoción de Trabajo de tesis (código 131001057).

Así mismo, agradecer el apoyo del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT-CONCYTEC). El presente trabajo forma parte del proyecto N°321-2011-CONCYTEC-OAJ.

A mis amigos Yvette y José, por su ayuda durante los años de estudio, por sus consejos y por su compañía en todas las actividades que compartimos. Estoy seguro de que serán unos profesionales de muy alto nivel.

A Juan Manuel y Raquel, gracias infinitas por su paciente ayuda y por orientarme durante el desarrollo de los ensayos moleculares, siempre me sentiré en deuda con ustedes.

Un enorme agradecimiento a Lisette, Yajahaira, Lenin, Wendy, Renzo, Dalia y Henry, por su valiosa colaboración en las salidas de campo y trabajo en el laboratorio, y sobre todo, gracias por su amistad.

A Víctor Jiménez por su valiosa ayuda y sugerencias.

Un agradecimiento especial a Evelyn Salazar, por acompañarme, comprenderme y motivarme durante estos años. Gracias por todo tu amor.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	i
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. INTRODUCCIÓN .....	- 1 -
2. MARCO TEÓRICO .....	- 4 -
2.1 Descripción de la tara .....	- 4 -
2.2 Mecanismos de reproducción en <i>Caesalpinia s.l.</i> .....	- 7 -
2.3 Distribución de la tara en Perú .....	- 8 -
2.4 Utilidad de la tara .....	- 8 -
2.5 Aspectos económicos y productivos de la tara .....	- 11 -
2.6 Filogenia y relaciones evolutivas .....	- 14 -
2.7 Diversidad genética .....	- 16 -
2.8 Caracterización de la diversidad genética .....	- 16 -
2.8.1 <i>Marcadores genéticos morfológicos</i> .....	- 17 -
2.8.2 <i>Análisis de datos multivariantes</i> .....	- 18 -
2.8.3 <i>Marcadores genéticos moleculares</i> .....	- 21 -
2.8.4 <i>Heterocigosidad esperada (<math>H_e</math>)</i> .....	- 23 -
2.8.5 <i>Número efectivo de alelos (<math>N_e</math>)</i> .....	- 24 -
2.8.6 <i>Índice de Shannon (<math>I</math>)</i> .....	- 24 -
2.9 Estructura poblacional y estadístico F .....	- 25 -
2.10 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) .....	- 27 -
2.11 Diversidad genética y conservación .....	- 27 -
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	- 30 -
3.1 Hipótesis .....	- 30 -

3.2	Objetivos .....	- 30 -
3.2.1	<i>Objetivo general</i> .....	- 30 -
3.2.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	- 30 -
4.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	- 32 -
4.1	Áreas de estudio.....	- 32 -
4.2	Colecta .....	- 35 -
4.3	Transporte de muestras y lugar de estudio.....	- 36 -
4.4	Análisis morfológico .....	- 37 -
4.5	Análisis molecular.....	- 38 -
4.5.1	<i>Extracción de ADN</i> .....	- 38 -
4.5.2	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y obtención de marcadores RAPD</i> .....	- 39 -
4.5.3	<i>Electroforesis de ADN</i> .....	- 40 -
4.5.4	<i>Análisis de loci amplificados</i> .....	- 40 -
4.5.5	<i>Análisis estadístico y evaluación de la diversidad genética</i> .....	- 41 -
5.	RESULTADOS.....	- 42 -
5.1	Análisis de diversidad genética basada en características morfométricas del fruto.....	- 42 -
5.1.1	<i>Descripción de datos morfométricos</i> .....	- 42 -
5.1.2	<i>Análisis de Componentes Principales (ACP)</i> .....	- 43 -
5.1.3	<i>Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas (AFDC)</i> .....	- 45 -
5.2	Análisis de la diversidad genética con base en marcadores RAPD.....	- 48 -
5.2.1	<i>Extracción de ADN</i> .....	- 48 -
5.2.2	<i>Análisis de diversidad con marcadores RAPD</i> .....	- 49 -
5.2.3	<i>Análisis de agrupamientos (clusters)</i> .....	- 51 -
5.2.4	<i>Análisis de estructura genética poblacional</i> .....	- 54 -

6. DISCUSIÓN.....	- 55 -
6.1 Evaluación de diversidad genética mediante análisis de caracteres morfológicos .....	- 56 -
6.2 Evaluación de la diversidad genética mediante el análisis de marcadores moleculares RAPD .....	- 59 -
6.2.1 <i>Análisis de agrupamiento (clusters)</i> .....	- 61 -
6.2.2 <i>Análisis de estructura genética poblacional</i> .....	- 62 -
6.3 Conservación .....	- 63 -
7. CONCLUSIONES.....	- 66 -
8. RECOMENDACIONES.....	- 67 -
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	- 68 -



## RESUMEN

Se evaluó la diversidad genética de tres poblaciones silvestres de *Caesalpinia spinosa* de las regiones de Cajamarca, Junín y Ayacucho. La diversidad genética se evaluó a partir de característica morfológicas del fruto y marcadores moleculares RAPD, para lo cual se colectaron 15 frutos maduros por planta, en un total de 6 plantas por cada población; así mismo, se colectaron hojas jóvenes para extraer el ADN y obtener los marcadores RAPD. Los caracteres morfológicos se midieron directamente y los datos obtenidos se analizaron mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas (AFDC) con el programa IBM SPSS Statistics (SPSS Inc.). Los marcadores RAPD se obtuvieron con el uso de los cebadores OPA-09, OPA-12, OPA-15, OPI-01 y OPI-04, de Qiagen OPERON. Los análisis de diversidad a partir de marcadores RAPD se realizaron con los programas POPGENE v.1.31 (F. Yeh *et al.*, 1999), FreeTree v.0.9.1.50 (A. Pavlicek, 1999) y ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2011). Los análisis de ACP y AFDC mostraron una amplia diversidad de características frutales dentro de cada población, sin embargo no se logró una eficiente diferenciación entre poblaciones. El análisis de marcadores moleculares RAPD evidenció una amplia diversidad genética en las tres poblaciones mediante los índices  $H_e$ ,  $N_e$  e  $I$ . El análisis de agrupamiento y el AMOVA mostraron que las poblaciones poseen diferencias genéticas significativas y que la variabilidad total se explica en un 60.84% por la variabilidad dentro de las poblaciones y en un 39.16% por la variabilidad entre las poblaciones. Los resultados sugieren la presencia de una amplia diversidad genética en las poblaciones, razón por la cual deben estructurarse programas de conservación para evitar perder este banco de genes y mejorar las características de importancia productiva en la planta.

**Palabras clave:** *Caesalpinia spinosa*, tara, diversidad genética, carácter morfológico, RAPD, distancia genética.

## ABSTRACT

This study evaluated the genetic diversity of three wild populations of *Caesalpinia spinosa* from the regions of Cajamarca, Junín and Ayacucho. The genetic diversity was evaluated from morphometric characteristics of the fruits and RAPD molecular markers, for which 15 mature fruits were collected per plant, in a total number of 6 plants per population; likewise, young leaves were collected to extract the DNA and obtain the RAPD markers. The morphometric characters were directly measured and the data obtained was analyzed by mean of Principal Components Analysis (PCA) and Canonical Discriminant Functions Analysis (CDFA) with the IBM SPSS Statistics software (SPSS Inc.). The RAPD markers were obtained with the use of primers OPA-09, OPA-12, OPA-15, OPI-01 and OPI-04, from Qiagen OPERON. The diversity analysis from RAPD markers was realized with POPGENE v.1.31 (F. Yeh *et al.*, 1999), FreeTree v.0.9.1.50 (A. Pavlicek, 1999) and ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2011) softwares. The PCA and CDFA analysis showed a wide diversity of fruit characteristics within populations, however, efficient differentiation among populations was not achieved. The RAPD molecular markers analysis evidenced a wide genetic diversity in the three populations through  $H_e$ ,  $N_e$  and  $I$  index. The clustering analysis and AMOVA showed that the populations have significant genetic differences and that the total variability is explained by 60.84% for the variability within the populations and 39.16% by the variability among the populations. The results suggest the presence of a wide genetic diversity in the populations, so conservation programs should be structured to avoid losing this gene bank and improve the characteristics of productive importance in the plant.

**Keywords:** *Caesalpinia spinosa*, tara, genetic diversity, morphometric character, RAPD, genetic distance.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tara es una especie de gran importancia económica, social y ambiental, razón por la cual ha sido denominada “El oro verde de los Incas” (Villanueva, 2 007). De hecho, la valoración de esta especie no es reciente, sino que ya nuestros antepasados habían descubierto muchas de sus bondades, por lo cual era muy usada.

Se tiene registros de que en tiempos prehispánicos era empleada por sus propiedades tintóreas, pues se obtenía un tinte oscuro, este uso se extendió durante la Colonia y empezó a ser usada en el curtido de cueros. Así se puso de manifiesto en la Ordenanza de los zapateros y silleros promulgada en 1 601. Los usos de la tara como planta medicinal también se iniciaron durante la época prehispánica (SEDAPAL, 2 000). Tales usos se mantienen hasta el día de hoy y hacen de la tara una de las plantas más importantes desde el punto de vista económico.

La tara crece de manera natural y silvestre. En un sistema agroforestal se encuentra asociado a silvopasturas, crece y se desarrolla muy bien asociada a papa, maíz, habas y otras plantas similares. No representa competencia para los cultivos; debido a sus raíces profundas, ayuda a fijar el nitrógeno de la atmósfera en el suelo y, además, su copa no es muy densa, por lo que deja pasar la luz que necesitan los otros cultivos para desarrollarse. Es utilizada también para delimitar los terrenos de las parcelas en forma de cercos vivos. Debido a su pequeño tamaño y sistema radicular profundo y denso es vinculada a prácticas de conservación de suelos en general, sobre todo en zonas áridas o semiáridas (Perúbiodiverso, 2 013).

Diversos estudios vienen encontrando nuevas propiedades en la tara, por ejemplo, Kloucek *et al.* (2 005) hallaron un gran poder antimicrobiano en extractos de tara, sobre todo en bacterias gram positivas; López *et al.* (2 011) encontraron que los extractos de

vainas de tara poseen además una gran actividad antioxidante, que explicaría muchas de sus propiedades farmacológicas; Rojas *et al.* (2011) mostraron que los extractos hidralcohólicos de tara aumentan significativamente la velocidad de cicatrización de quemaduras y Castañeda *et al.* (2012) encontraron en extractos de vainas una fracción rica en galatoninas con efectos citotóxicos en una línea celular de leucemia. Esta es solo una muestra de la gran cantidad de estudios que se han hecho y se vienen realizando en torno a las propiedades benéficas que representa la tara para la salud.

El Perú exporta productos derivados de la tara desde hace más de 60 años y se ha constituido en el primer productor mundial de harina y goma de tara. En el Perú la mayor parte de la producción es el resultado de procesos de recolección de árboles naturales o manejados (Narváez *et al.*, 2009). El gran valor económico de la tara y la gran variedad de usos que hacen de ella los pobladores locales, puede ocasionar una gran presión extractiva sobre todo en poblaciones silvestres, pudiendo ocasionar la pérdida de diversidad genética por depredación (Larrea, 2010). Por ello es de suma urgencia establecer sistemas adecuados de producción y conservación de esta planta.

Es bien sabido que un paso importante para el establecimiento de sistemas de conservación de poblaciones de una especie determinada es el conocimiento de su diversidad genética, así como la distribución de esta diversidad dentro y entre las poblaciones. Se ha visto que especies en peligro de extinción poseen una menor diversidad genética que aquellas que no están en peligro, como por ejemplo en el caso de las plantas *Cerastium fischerianum* var. *molle*, *Lysimachia minoricensis* de Minorca y *Wollemi pine* de Australia, estudiadas con marcadores moleculares RAPD o AFLP (Frankham *et al.*, 2002).

En ese sentido, este estudio pretende aportar, con el conocimiento de la diversidad genética de tres poblaciones de tara procedentes de lugares distantes del Perú, la base a

futuras investigaciones que contribuyan en el campo de la conservación de recursos naturales o al de la producción sostenible.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Descripción de la tara

*Caesalpinia spinosa* (Feuillée ex Molina) Kuntze (Tropicos.org), cuyo nombre fue otorgado en honor al filósofo y botánico italiano Andrea Caesalpinia (1 524 – 1 603) (Villanueva, 2 007), es un árbol nativo de los Andes que crece, de forma silvestre o cultivada, en varios países de la región andina de Sudamérica (Narváez *et al.* 2 009). Otros nombres sinónimos son: *Caesalpinia pectinata* Cav., *Caesalpinia tara* Ruiz & Pav., *Caesalpinia tinctoria* (Kunth) Benth. ex Reiche, *Caesalpinia tinctoria* Dombey ex DC., *Coulteria tinctoria* Kunth, *Poinciana spinosa* Feuillée ex Molina y *Tara spinosa* (Feuillée ex Molina) Britton & Rose (Tropicos.org).

Los nombres comunes de la especie son “taya” en el Perú; “divi-divi de tierra fría”, “cuica” o “serrano” en Colombia, “vinillo” o “guarango” en el Ecuador; “tara” (que parece ser el nombre más conocido internacionalmente) en Perú, Bolivia, Chile y Venezuela, y “acacia amarilla” o “dividivi” de los Andes” en Europa (Narváez *et al.* 2 009).

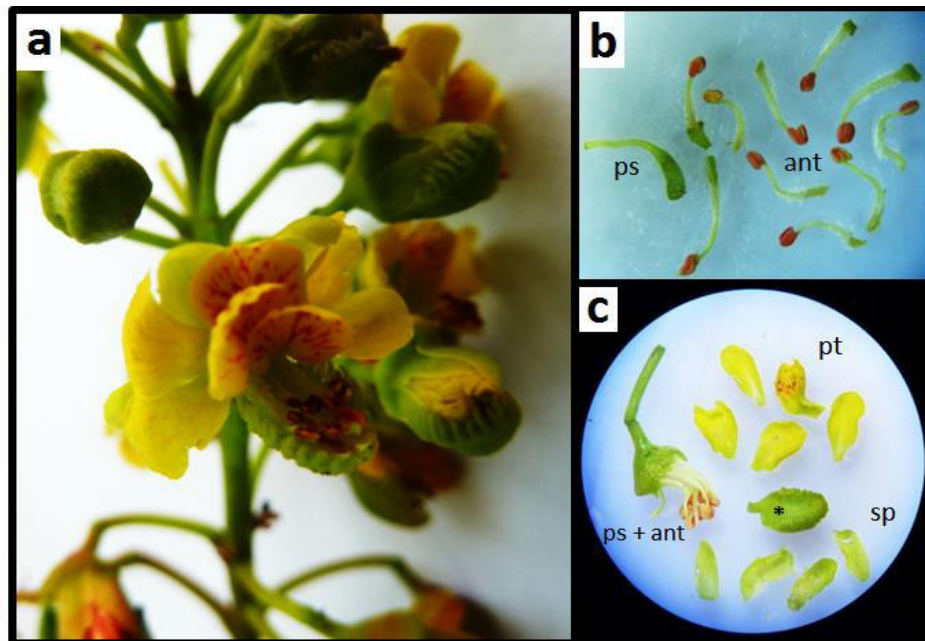
Se le encuentra a lo largo de las zonas áridas y semiáridas de Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú y el norte de Chile, teniendo la mayor extensión y productividad entre los 4° y 20° de latitud sur, principalmente en el Perú. Es un cultivo rústico de amplia adaptabilidad que se desarrolla hasta los 2 800 m.s.n.m., pudiendo llegar excepcionalmente, como ocurre en el Perú, hasta los 3 150 m.s.n.m. (Villanueva, 2 007).

Es un arbusto o árbol siempreverde, con espinas en tallo y ramas, de 3 a 8 metros de altura. El tronco redondo, espinoso y a veces torcido de *C. spinosa* posee una corteza gris y se ramifica ampliamente en ejes foliosos y espinosos. En varios casos los ejes se ramifican desde cerca de la base del tronco, dando la impresión de que son varios

troncos. Las hojas son verde oscuras, lisas o laxamente espinosas y de hasta 10 cm de largo; son bipinnaticompuestas paripinnadas, con 2 a 3 (hasta 5) pares de foliolos, los que poseen de 5 a 8 pares de foliolulos opuestos, elípticos a aovados, de 1,4 a 4 (hasta 4,5) cm de largo y de 1 a 2,5 cm de ancho. Los foliolulos tienen nerviación reticulada, con el envés pubescente o no, y el ápice obtuso hasta emarginado. Las flores se disponen en racimos terminales multifloros, finamente pubescentes y algo espinosos, de 15 a 20 cm de largo (Figura 1). Las flores, de 9 a 10 mm (con un máximo de 15 mm) de largo, tienen un pedúnculo de 5 mm de largo, finamente pubescente. El cáliz es pentámero, asimétrico, con sépalos fusionados en la base, de hasta 6 mm de largo, con el sépalo ventral más grande, en forma de canoa y con dientes conspicuos en el ápice (Figura 2). Los pétalos son rojo-amarillentos, que con 8 a 9 mm de largo, son menos del doble del largo del cáliz y casi tan largos como los 10 estambres, que son amarillos. Solo raramente los estambres sobrepasan la corola. El fruto es rojizo-café claro, plano, y con frecuencia finamente pubescente; es una legumbre coriácea indehisciente, de 6 a 10 cm de largo y 1,0 a 2,5 cm de ancho; en la madurez posee de 4 a 8 semillas redondas y negras (Dostert *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Representación de las hojas, frutos y órganos reproductivos de *Caesalpinia spinosa* (tomado de Luis Balaguer *et al.*, 2 011).



**Figura 2.** Estructuras florales de *C. spinosa*. (a) Flor de un individuo de *Caesalpinia spinosa*. (b) Pistilo (ps) y anteras (ant) de una flor de *C. spinosa*, donde pueden contarse un total de 10 anteras. (c) Se muestran los 5 pétalos (pt), 5 sépalos (sp) y el pistilo y anteras (ps + ant) unidos al pedúnculo. Se muestra también el sépalo con forma de canoa (\*). (Foto: Diego Orihuela).



## 2.2 Mecanismos de reproducción en *Caesalpinia* s.l.

La importancia de los mecanismos de polinización y los efectos de los sistemas de apareamiento en la estructura genética poblacional de especies vegetales han sido a menudo abordados (Ge *et al.*, 1 999). *Caesalpinia* sensu lato (s.l.) ha sido poco estudiada en cuanto a su biología reproductiva (Lewis *et al.*, 1 999) y no se han registrado estudios de este tipo en la especie *Caesalpinia spinosa*, que permitan explicar mejor su estructura genética poblacional. Sin embargo, Borges *et al.* (2 009) hicieron una revisión de los estudios de biología reproductiva en el género *Caesalpinia*, en la cual señalan que el sistema de polinización más frecuente en la familia Caesalpinioideae es a través de abejas y otros insectos parecidos (Figura 3), la andromonoicidad y el hermafroditismo son comunes en el género y la autoincompatibilidad (SI, por las siglas en inglés de *self-incompatibility*) es un mecanismo que predomina en este grupo.



**Figura 3.** Inflorescencia de *Caesalpinia spinosa* visitada por un polinizador. (Foto tomada de Larrea, 2 010).

### 2.3 Distribución de la tara en Perú

En Perú *C. spinosa* está distribuida a lo largo de toda la costa, desde Piura hasta Tacna, y en la sierra en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Huancavelica, Junín y Pasco. También lo reportan en Madre de Dios, pero podría tratarse de individuos cultivados. En la vertiente occidental de los Andes se encuentra en las laderas andinas, valles y orilla de ríos, desde el nivel del mar hasta los 3 000 m. En el pasado la especie se encontraba también en la lomas de Perú (por ejemplo, en Lachay, departamento de Lima, a menos de 1 000 m.s.n.m.), donde fue prácticamente extinguida debido a su sobreutilización como combustible y material de construcción. Climáticamente, el área de distribución se extiende desde templado cálido seco ("*Warm Temperate Dry*") hasta tropical muy seco ("*Tropical Very Dry*") y bosque tropical húmedo ("*Tropical Wet Forest*"). *Caesalpinia spinosa* es cultivada sobre todo en los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ayacucho, Huancavelica, Apurímac, Ancash y Huánuco, desde 1 000 a 2 900 m.s.n.m. (Dostert et al., 2 009).

### 2.4 Utilidad de la tara

La tara fue empleada por las culturas preincas e incas en la elaboración de tintes para textilería, cerámica, curtido de pieles y medicina (Villanueva, 2 007).

Entre sus cualidades se destaca la presencia de taninos en la vaina, que son considerados una alternativa preferible al uso del cromo y otros productos tóxicos en el proceso de curtiembre de cuero. El tanino de la tara es pirogalol, un tanino hidrolizable. Estos compuestos le confieren al cuero tratado resistencia y elasticidad, los taninos reaccionan con el tejido en la piel de los animales, conservando su flexibilidad y volviéndola resistente a la putrefacción. La tara produce un cuero de color claro, que lo

hace bastante adecuado para la elaboración de cueros de dicho tono (Profound, 2008). Los taninos, además, son utilizados actualmente en la fabricación de diversos productos como plásticos y adhesivos, galvanizados y galvanoplásticos, así como para la conservación de aparejos de pesca por su condición bactericida y fungicida; se usan así mismo como clarificadores de vinos y como sustitutos de la malta para dar cuerpo a la cerveza; en la industria farmacéutica tienen un amplio uso terapéutico y cosmetológico, también se utilizan en protección de metales, perforación petrolífera, industria del caucho, mantenimiento de pozos de petróleo y como parte de las pinturas por su acción anticorrosiva (Narváez et al., 2009). El tanino es apreciado también en la industria del teñido por sus cualidades como mordiente. Varios usos medicinales vernaculares se reportan para la especie: la infusión de hojas es eficaz cicatrizante en las heridas ulcerosas, las vainas preparadas de manera similar proveen de un gargarismo eficaz para la amigdalitis e infecciones bucales (Ogata, 2006).

Otro producto obtenido de la especie es el ácido gálico, utilizado como antioxidante en la industria del aceite y en la industria cervecera como un elemento blanqueador o decolorante, así como en productos relacionados con fotografía, tintes, manufactura del papel, farmacia y grabado o litografía. En la industria farmacéutica forma parte de medicamentos gastroenterológicos para curar úlceras y de medicamentos cicatrizantes, antiinflamatorios, antisépticos, antidiarreicos, antimicóticos, antibacterianos, antiescorbúticos, odontálgicos y antidisentéricos.

Además, la semilla es fuente de aceites, harina proteica y derivados como jabones, pinturas, barnices, esmaltes, tintes de imprenta, mantecas y margarinas comestibles, pues presenta un contenido de ácidos libres de 1,4% (ácido oleico); es aceptable comercialmente por su baja acidez (Narváez et al., 2009). La goma de tara, obtenida a partir del endospermo y germen de la semilla, es un espesante y estabilizador; esta

produce soluciones altamente viscosas, incluso en concentraciones de 1% (Profound, 2 008).

La madera es de muy buena calidad por lo que se utiliza para la construcción y confección de herramientas agrícolas, utensilios domésticos, al igual que la leña y carbón producidos, que tienen excelente poder calorífico (Ogata, 2 006).

En el campo agroforestal la tara ha ganado mucho interés; por su porte bajo y su tendencia a ramificar desde la base, es manejada con frecuencia para formar cercos vivos alrededor de los cultivos. Los “aguijones” o “espinas” que posee, la convierten en un buen cerco protector. Así mismo tiene buena capacidad de rebrote cuando está joven, lo que permite obtener biomasa de los cercos, con fines de leña y producción de varillas. En otros aspectos, dado su porte pequeño y su sistema radicular profundo y denso, es apropiada para prácticas vinculadas a la conservación de suelos en general, diseño de barreras vivas, sobre todo en zonas áridas o semiáridas (Ogata, 2 006). En la Tabla 1 se muestran los efectos benéficos al medio ambiente de la plantación de tara.

**Tabla 1.** Matriz ambiental de la cadena productiva de tara. (Tomado y modificado de Mancero, 2 008).

Factor que afecta al medio ambiente	¿Cómo afecta al medio ambiente?
La plantación	<p>Al ser una leguminosa aporta nitrógeno a la tierra.</p> <p>En cultivos agroforestales aporta nitrógeno al suelo y puede ser usada en asociación con maíz, papa, cebada o sorgo.</p> <p>Debido a su pequeño porte y a su sistema radicular profundo y denso, es preferida para barreras vivas, control de cárcavas y otras prácticas vinculadas a conservación de suelos, sobre todo en zonas áridas o semiáridas.</p> <p>Especie que no demanda grandes cantidades de agua (600 mm de lluvia ó 4 000 a 6 000 m<sup>3</sup>/ha/año en zonas áridas); a secano su crecimiento es lento y tiene alta tolerancia a épocas</p>

	<p>de sequía.</p> <p>Es una especie melífera, por lo que se puede combinar con apicultura.</p> <p>Las hojas pueden ser consumidas por el ganado cuando las plantas son pequeñas; como fuente de forraje es ideal.</p> <p>Posibilidad de manejar una especie forestal como alternativa económica.</p> <p>Extracción de curtientes vegetales sin matar al árbol.</p>
--	--

Durante los últimos años se han venido realizando estudios sobre los beneficios de la tara para la salud humana. Las investigaciones sobre la actividad de una fracción enriquecida con polifenoles hidrolizables (P2Et), obtenida a partir de extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, concluyen que el uso de dicha fracción junto a la quimioterapia convencional podría incrementar la efectividad terapéutica del tratamiento de la leucemia (Castañeda *et al.*, 2012). Por otro lado, también se han hecho estudios sobre la efectividad de extractos hidroalcohólicos de tara en el tratamiento de quemaduras (Rojas *et al.*, 2011).

## 2.5 Aspectos económicos y productivos de la tara

La principal fuente actual de tara son los bosques naturales de la región andina de Sudamérica, donde algunas explotaciones agroforestales son introducidas. Perú representa la mayor área de crecimiento de tara para la obtención de taninos, seguido de lejos por Bolivia, Chile, Ecuador y Colombia (Castell, 2012).

Cerca del 80% de la producción mundial de tara tiene lugar en Perú. Entre 1993 y 2003 la producción de tara en Perú aumentó de aproximadamente 6 000 toneladas a 13 264

toneladas de vainas de tara. Las principales regiones productoras son Cajamarca (36%), La Libertad (22%), Lambayeque (21%), Ayacucho (7%), Huánuco (5%) (Profound, 2 008).

Los agricultores y recolectores que cosechan la tara la venden en el mercado al mejor postor. En los últimos años, la provisión de tara de estos productores no satisfizo la demanda y los compradores de grandes cantidades de tara agravaron la situación de escasez. Algunos procesadores, por tanto, han iniciado su propia producción de tara. (Profound, 2 008).

La mayoría de plantas de *C. spinosa* en Perú crecen en regiones propensas a lluvias torrenciales. Debido a que la calidad de los caminos no es buena, la lluvia puede demorar la entrega de las vainas de tara varias semanas (Profound, 2 008).

Al ser la tara originaria de Perú y encontrarse también poblaciones de árboles en Ecuador y Bolivia en los valles interandinos y en la vertiente occidental del Pacífico, es una alternativa de desarrollo para los productores ya que tiene dos ventajas: por un lado, genera ingresos económicos por la comercialización de sus frutos a partir del cuarto año y, por otro, al ser una especie forestal ofrece muchas ventajas a nivel ecológico y de conservación de suelos (Mancero, 2 009).

La cadena de suministro de tara comienza con la siembra de semillas en campos de cultivo agroforestales o con la cosecha de frutos de árboles silvestres de bosques naturales. La mayor parte de la producción de tara se inicia a partir de la recolección de frutos silvestres; así, el mayor problema viene a ser las diferencias de calidad entre tara colectada y tara cultivada (Castell, 2 012).

Los actores de la producción y cadena de suministro son aquellos que están involucrados en el proceso económico, desde el cultivo, cosecha, acopio, transformación y venta del producto y los usuarios finales. No obstante, la mayor fuente de frutos de tara son los

bosques silvestres y, solo en ciertas áreas, los frutos de tara provienen de cultivos (Castell, 2 012).

Las tendencias de consumo mundial de tara se centran en los sectores industriales de cueros, alimentos y cosméticos (Profound, 2 008).

Las oportunidades en la industria del cuero surgen debido a la tendencia creciente de reemplazar sustancias tóxicas como las sales de cromo utilizadas como curtidores, por sustancias menos nocivas como los taninos naturales que cumplen la misma función. Esta tendencia se percibe claramente en la Unión Europea (UE), donde se encuentran las industrias más grandes e importantes de cuero a nivel mundial. La UE ha elaborado una estricta legislación sobre manejo de residuos y los consumidores son cada vez más conscientes de las consecuencias para el medio ambiente. Así, las curtiembres están mejorando su gestión de residuos, pero también están intentando reemplazar las sales de cromo y otros metales o, por lo menos, minimizar su uso. Los taninos de tara son un excelente sustituto (Profound, 2 008).

En el sector alimenticio, la goma de tara puede ser usada en sistemas de reemplazo de grasas, y los comerciantes pueden sacar mayores ganancias de esta tendencia brindando información completa y exacta acerca de las características y del uso apropiado de las gomas en dichos sistemas. Además, otro cambio en las preferencias del consumidor es la tendencia hacia lo natural. Una gran cantidad de fabricantes de productos alimenticios responden a esta demanda de productos naturales, sustituyendo ingredientes sintéticos por ingredientes naturales. Una vez más, los comerciantes tienen un papel importante en lo que respecta informar y aconsejar a los fabricantes de productos alimenticios acerca de las gomas naturales (Profound, 2 008).

La preferencia por lo natural se ve reflejada también en la industria de cosméticos. Es interesante notar que una proporción cada vez mayor de productos cosméticos naturales es ahora también orgánica o por lo menos contienen una gran proporción de ingredientes orgánicos (Profound, 2 008). Este hecho favorece en gran medida al mercado de la tara, ya que promueve una mayor demanda de sus derivados.

De acuerdo a fuentes de la industria, actualmente la oferta no satisface la demanda de tara, lo que se refleja en un sólido incremento en los precios de la misma (Profound, 2 008). En ese sentido, hay claras oportunidades para los agricultores de incrementar la producción para suministrar polvo de tara a las industrias de cuero y goma de tara a las industrias alimentarias y cosméticas.

## **2.6 Filogenia y relaciones evolutivas**

*Caesalpinia* s.l. (Fabaceae subfamilia Caesalpinioideae) es un grupo pantropical que posee aproximadamente 150 especies de árboles, arbustos y lianas que crecen generalmente en hábitats secos y semiáridos. Este género no solo necesita una revisión taxonómica a nivel de especies, sino una reorganización en el nivel intragenérico. Mientras que los análisis morfológicos y moleculares han demostrado claramente que *Caesalpinia* s.l. no es monofilético, la falta de muestreos densos y robustez de soporte de las filogenias han dejado muchas dudas sobre cuántos géneros deberían ser reconocidos y cómo deberían ser delimitados.

El grupo informal *Caesalpinia* propuesto por Polhill y Vidal originalmente comprendía 16 géneros, incluyendo al entonces más o menos limitado género *Caesalpinia*. Este grupo fue considerado uno de los más distintivos de los nueve grupos genéricos informales en la tribu Caesalpinieae, basado en un conjunto de caracteres morfológicos que incluían la presencia de un sépalo cuculado inferior en el caliz, así como la mayor ocurrencia y



diversidad de espinas, tricomas y estructuras secretorias dentro de la tribu. Sobre la base de estos caracteres, Pihill y Vidal también incluyeron a *Conzattia*, *Lemuropisum* y *Parkinsonia* en el grupo *Caesalpinia*, pero posteriormente se demostró que estos tres géneros pertenecen al grupo *Peltophotum*. *Caesalpinia* s.l. encapsula las dificultades y dilemas relacionados con la delimitación genérica (Gagnon *et al.*, 2 013).

La aparente falta de sinapomorfías morfológicas diagnósticas obvias para cada género, que provea bases claras para el agrupamiento de especies que no han sido muestreadas en filogenias moleculares, es una de las mayores dificultades en la clasificación de *Caesalpinia* s.l. Esto es, en parte, debido a los grandes niveles de homoplasia para muchos caracteres morfológicos en *Caesalpinia* s.l. Como resultado, algunos autores consideraron que *Caesalpinia* es un género polimórfico amplio, mejor dividido en el nivel infragenérico en múltiples secciones. Otros plantearon que *Caesalpinia* debería ser separada en múltiples géneros basados en subgrupos específicos de caracteres morfológicos (Gagnon *et al.*, 2 013).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de tara según APG III (2 009) y Tropicos.org.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal
<b>Clase</b>	Equisetopsida C. Agardh
<b>Subclase</b>	Magnoliidae Novák ex Takht.
<b>Superorden</b>	Rosanae Takht.
<b>Orden</b>	Fabales Bromhead
<b>Familia</b>	Fabaceae Lindl.
<b>Género</b>	<i>Caesalpinia</i> L.
<b>Especie</b>	<i>Caesalpinia spinosa</i> (Feuillée ex Molina) Kuntze

## **2.7 Diversidad genética**

La diversidad genética representa secuencias ligeramente diferentes; en consecuencia, variantes en las secuencias de ADN pueden resultar en diferencias en las secuencias de aminoácidos de la proteína codificada por el gen. Tal variación proteica puede ocasionar diferencias morfológicas o bioquímico-funcionales que causan diferencias en la tasa reproductiva, supervivencia o comportamiento de los individuos.

La diversidad genética es requerida por las poblaciones para adaptarse a los cambios medioambientales. Puede ser medida a través de un conjunto de métodos moleculares y cuantitativos. Las poblaciones grandes con especies naturalmente exógamas usualmente poseen una amplia diversidad genética, pero es comúnmente reducida en poblaciones y especies poco conservadas (Frankham *et al.*, 2 002).

## **2.8 Caracterización de la diversidad genética**

En la caracterización de una especie se estima la variabilidad existente en el genoma de la población de individuos que la conforman. Los seres vivos poseen en su genoma la información codificada en forma de genes para establecer su identidad morfológica y desarrollar todos sus procesos y funciones vitales. Se estima que las plantas superiores poseen un poco más de 400 000 genes con funciones particulares y un buen número de ellos ha creado variantes por efectos evolutivos y del medio ambiente. Esas variantes se van acumulando entre los diferentes miembros componentes de la especie y la suma de todos los efectos de los genes y sus variantes es lo que se denomina variabilidad genética de una especie.

El efecto de los genes puede o no expresarse en características identificables de forma visual. Esto quiere decir que hay una variabilidad que se puede detectar a simple vista y

otra que, aunque no es visible fácilmente, también existe en la especie pero que requiere de técnicas especiales para ser detectada (Franco *et al.*, 2 003). En este sentido, se pueden diferenciar dos tipos de marcadores genéticos de diversidad: los morfológicos y los moleculares (Azofeifa-Delgado, 2 006).

La caracterización basada en rasgos morfológicos, fisiológicos y horticulturales tiene distintas desventajas puesto que es regulada durante el desarrollo o influenciada por las interacciones del genotipo y el ambiente o prácticas culturales como podas e injertos. Por otro lado, los marcadores moleculares son muy usados en la caracterización e identificación de cultivares porque no están influenciadas por condiciones medioambientales variables, y puede discriminar entre cultivares con fenotipos similares (Yonemoto *et al.*, 2 007).

#### 2.8.1 Marcadores genéticos morfológicos

En relación con el fenotipo, los caracteres que lo conforman corresponden en su gran mayoría a la descripción morfológica de la planta y su arquitectura. Estos caracteres se denominan descriptores morfológicos y se pueden agrupar en los siguientes tipos (Franco *et al.*, 2 003):

*Botánicos-taxonómicos.* Corresponden a los caracteres morfológicos que describen e identifican la especie y son comunes a todos los individuos de dicha especie. Por lo general tienen alta heredabilidad y poca variabilidad, aunque en especies cultivadas pueden encontrarse unos pocos que muestran diversos grados de variabilidad, como en el tipo y la forma de hoja, la forma del fruto y las características de la flor.

*Morfoagronómicos.* Corresponden a caracteres morfológicos relevantes en la utilización de las especies cultivadas. Incluyen caracteres importantes desde el punto de vista de necesidades agronómicas, mejoramiento genético y de mercadeo y consumo. Por

ejemplo: forma de hojas; pigmentaciones en raíz, tallo, hojas y flores; color, forma y brillo en semillas; tamaño, forma y color de frutos; arquitectura de planta expresada en hábito de crecimiento y tipos de ramificación. También suelen incluirse descriptores relacionados con componentes de rendimiento los cuales, a pesar de tener una heredabilidad aceptable, son afectados por cambios ambientales.

*Evaluativos.* Esta porción de la variabilidad se expresa como respuesta a estímulos ambientales bióticos (plagas y enfermedades) o abióticos (estrés por temperatura, agua, nutrientes). En general, la respuesta se expresa en características de tipo cualitativo.

La variabilidad fenotípica o “detectable visualmente” se puede dividir en los siguientes tipos (Franco *et al.*, 2003):

- (1) Las características responsables de la morfología y la arquitectura de la planta utilizadas en un principio para la clasificación botánica y taxonómica, aunque en muchas de ellas se pueden encontrar variantes.
- (2) Una serie de características relacionadas especialmente con aspectos de manejo agronómico y de producción de la especie que son de interés para mejoradores y agrónomos.
- (3) Un grupo de características que solo se expresan como reacción a estímulos del medio ambiente. Estos pueden ser bióticos como plagas y enfermedades, o abióticos como sequías o deficiencias minerales. Para su correcta cuantificación, generalmente, se requiere diseños experimentales separados de la caracterización morfoagronómica.

### 2.8.2 Análisis de datos multivariantes

El análisis de datos multivariantes tiene por objeto el estudio estadístico de varias variables medidas en elementos de una población. Pretende los siguientes objetivos:

1. Resumir el conjunto de variables en unas pocas nuevas variables, construidas como transformaciones de las originales, con la mínima pérdida de información.
2. Encontrar grupos en los datos, si existen.
3. Clasificar nuevas observaciones en grupos definidos.
4. Relacionar dos conjuntos de variables.

El análisis multivariante de datos proporciona métodos objetivos para conocer cuántas variables indicadoras, que a veces se denomina factores, son necesarias para describir una realidad compleja y determinar su estructura.

Las técnicas de análisis multivariante tienen aplicaciones en todos los campos científicos y comenzaron desarrollándose para resolver problemas de clasificación en biología y han alcanzado una gran aplicación en ingeniería y ciencias de la computación como herramientas para resumir la información y diseñar sistemas de clasificación automática y de reconocimiento de patrones.

#### *2.8.2.1 Análisis de Componentes Principales*

El análisis de componentes principales tiene este objetivo: dadas  $n$  observaciones de  $p$  variables, se analiza si es posible representar adecuadamente esta información con un número menor de variables construidas como combinaciones lineales de las originales. Por ejemplo, con variables con alta dependencia es frecuente que un pequeño número de nuevas variables (menos del 20% de las originales) expliquen la mayor parte (más del 80%) de la variabilidad original.

La técnica de componentes principales es debida a Hotelling (1933), aunque sus orígenes se encuentran en los ajustes ortogonales por mínimos cuadrados introducidos por K. Pearson (1901). Su utilidad es doble:

1. Permite representar óptimamente en un espacio de dimensión pequeña, observaciones de un espacio general  $p$ -dimensional. En este sentido componentes principales es el primer paso para identificar posibles variables latentes o no observadas, que están generando la variabilidad de los datos.
2. Permite transformar las variables originales, en general correlacionadas, en nuevas variables incorrelacionadas, facilitando la interpretación de los datos (Peña, 2 002).

#### *2.8.2.2 Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas*

En este caso, el planteamiento estadístico del problema es el siguiente: se dispone de un conjunto amplio de elementos que pueden venir de dos o más poblaciones distintas y en cada elemento se observa una variable aleatoria  $p$ -dimensional  $x$ , cuya distribución se conoce en las poblaciones consideradas. El objetivo es clasificar un nuevo elemento, con valores de las variables conocidas, en una de las poblaciones.

El problema de discriminación aparece en muchas situaciones en que necesitamos clasificar elementos con información incompleta, en otros casos la información podría estar disponible pero puede requerir destruir el elemento, como en el control de calidad de la resistencia a la tensión de unos componentes. Finalmente, en otros casos la información puede ser muy costosa de adquirir.

Existen varios enfoques posibles para este problema. El primero es el análisis discriminante clásico debido a Fisher, basado en la normalidad multivariante de las variables consideradas y que es óptimo bajo dicho supuesto. Si todas las variables son continuas, es frecuente que aunque los datos originales no sean normales se pueda transformar las variables para que lo sean, y existen métodos que pueden aplicarse a las variables transformadas. Sin embargo, cuando se tienen variables discretas y continuas para clasificar, la hipótesis de normalidad multivariante es poco realista (Peña, 2 002).

### 2.8.3 Marcadores genéticos moleculares

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia no típica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula orgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Se menciona la existencia de dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN.

Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Azofeifa-Delgado, 2 006).

#### *2.8.3.1 Marcadores de ADN*

Estos marcadores genéticos permiten visualizar diferencias tangibles entre secuencias homólogas de ADN de los organismos. Esas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Este tipo de marcadores detecta variaciones directas a nivel de ADN y tienen ventajas tales como el hecho de ser dominantes o codominantes, de desarrollarse de manera estable, de carecer de efectos pleiotrópicos y sobre todo, de no estar sujetos al ambiente en donde se desarrolla el organismo en estudio, principalmente. Las propiedades mencionadas hacen que sean extremadamente útiles, comparados con los análisis a nivel morfológico o de proteínas (Valadez *et al.*, 2 000). Algunos ejemplos de marcadores moleculares son: Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados

(AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO), etc. (Azofeifa-Delgado, 2006). De todos los ejemplos nombrados, los marcadores RAPD poseen múltiples ventajas, las cuales los han hecho uno de los más usados para el estudio de polimorfismos y para diferenciar variedades en plantas (Bansal *et al.*, 2012).

#### 2.8.3.2 Marcadores RAPD

Este análisis fue descrito por primera vez el año 1990 por dos grupos de investigación independientes: Williams *et al.* y Welsh y McClelland (Azofeifa-Delgado, 2006). Williams *et al.* (1990) señalan que el mapeo genético mediante marcadores RAPD tiene múltiples ventajas sobre otros métodos, tales como la posibilidad de usar un set universal de *primers* para el análisis genómico de una gran variedad de especies y la no necesidad de trabajos preliminares como el aislamiento de ADN clonado, preparación de filtros para híbridos o secuenciamiento nucleotídico.

La técnica de RAPD ha sido la metodología más ampliamente utilizada en la PCR para diferentes propósitos. Utiliza pequeños iniciadores de oligonucleótidos de secuencias aleatorias que generalmente tienen un contenido de GC mayor a 50%. Estos iniciadores (cebadores) no contienen secuencias repetidas inversas internas (autocomplementarias) y se unen a distintos sitios del genoma, si es que existen diferentes sitios blanco para ellos. Esta unión es reconocida por la enzima ADN polimerasa (*Taq* polimerasa) que inicia el alargamiento del iniciador a partir del extremo 3'; el alargamiento resultante produce una cadena de ADN, cuya secuencia de bases es complementaria a la cadena molde. El producto de la amplificación se acumulará en un gran número de copias (aprox.  $10^6$ ) y puede ser visualizado por electroforesis después de teñir el gel. Una amplificación es exitosa solo si el sitio blanco para el iniciador está localizado en ambas cadenas del ADN



molde en polaridad opuesta y a una distancia de 50 – 6 000 pares de bases en promedio (Valadez *et al.*, 2 000).

Entre todos los marcadores moleculares, los marcadores RAPD han sido seleccionados prioritariamente para examinar la diversidad genética de germoplasma vegetal, para identificar germoplasma y variedades y para confirmar la relación entre especies o subespecies, ya que posee ventajas como su rapidez y relativa simplicidad, bajo costo y gran veracidad (Zheng *et al.*, 2 009). No obstante, a pesar de sus múltiples ventajas, poseen algunas desventajas: alteraciones en el ADN, en las concentraciones de ADN molde, polimerasa, cebadores y magnesio pueden ocasionar la producción de fragmentos diferentes. Por este motivo, los marcadores RAPD no siempre resultan ser reproducibles cuando se llevan a cabo en diferentes laboratorios. Generalmente es mejor replicar los experimentos y usar controles apropiados cuando se compara un experimento con otro (Fairbanks *et al.*, 1 993).

#### 2.8.4 Heterocigosidad esperada ( $H_e$ )

La diversidad genética en *loci* únicos es caracterizada mediante la heterocigosidad esperada, heterocigosidad esperada y diversidad alélica. Para un *locus* simple con dos alelos con frecuencias  $p$  y  $q$ , la heterocigosidad esperada  $H_e = 2pq$  (también llamada diversidad génica). Cuando hay más de dos alelos, existen expresiones relativas. No obstante, en estos casos es más simple calcular la heterocigosidad esperada como 1 menos la suma de cuadrados de las frecuencias alélicas:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^{No.alelos} p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo.  $H_e$  es usualmente reportada en preferencia a la heterocigosidad observada debido a que es menos afectada por el método de muestreo (Frankham *et al.*, 2002).

#### 2.8.5 Número efectivo de alelos ( $N_e$ )

Es un tipo de medida basada en el número de alelos. Se define como el número de alelos que debiera haber para obtener la misma heterocigosidad si todos tuvieran la misma frecuencia y es menos influenciada por alelos raros. Esta medida es usada también por ser menos sensible al tamaño de muestra. El  $N_e$  es calculado de la siguiente manera:

$$n_e = 1 / \sum p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia de cada alelo y los valores son sumados para todos los alelos. El número efectivo de alelos solo iguala al número actual cuando todos los alelos poseen la misma frecuencia y, en la mayoría de los casos,  $N_e$  es mucho menor que la diversidad alélica ( $A$ ) (Frankham *et al.*, 2002).

#### 2.8.6 Índice de Shannon ( $I$ )

Este índice es utilizado cuando se cuenta con marcadores dominantes, ya que los datos se deben interpretar desde el punto de vista fenético o fenotípico. Esta interpretación consiste en considerar cada banda como un carácter fenotípico independiente, contabilizando simplemente la presencia o ausencia de cada banda.

El índice de Shannon de una población  $j$  se define como:

$$I_j = - \sum_{i=1}^m p_{ij} \ln p_{ij}$$

donde  $m$  es el número de caracteres (bandas) considerado,  $p_{ij}$  es la frecuencia del carácter  $i$  (banda  $i$ ) en la población  $j$ . El valor mínimo de  $I_j$  es cero y se hace mayor al aumentar la diversidad (Moreno-Vázquez, 2001).

## 2.9 Estructura poblacional y estadístico F

En una población subdividida, se puede considerar tres niveles de diferenciación genética: dentro de cada subpoblación, entre subpoblaciones y en el conjunto de subpoblaciones (es decir, en la metapoblación). Sewall Wright desarrolló un método de análisis de la variabilidad genética a estos tres (o más) niveles, mediante el estadístico F.

En el primer nivel, se calcula la heterocigosis media intra-subpoblacional ( $H_I$ ):

$$H_I = \sum_i^k \frac{H_i}{k}$$

donde  $H_i$  es la heterocigosis observada en la subpoblación  $i$  y  $k$  el número de subpoblaciones.

Al segundo nivel, entre subpoblaciones, calculamos primero la heterocigosis esperada ( $H_S$ ) para cada subpoblación ( $S$ ), considerando los  $i$  alelos de cada locus:

$$H_S = 1 - \sum_i p_{i,S}^2$$

Y después la  $H_S$  media de las  $k$  poblaciones:

$$\overline{H_S} = \sum_S^k \frac{H_S}{k}$$

Al nivel metapoblacional, se calcula la heterocigosis total ( $H_T$ ) que se esperaría si todas las subpoblaciones constituyeran, en realidad, una única población panmíctica: donde  $p_i$  es la frecuencia media del alelo  $i$  en la metapoblación.

En los mismos tres niveles, se calcula ahora los respectivos valores de  $F$ , que representa la disminución de la heterocigosis originada por apareamiento aleatorio.

En el nivel intra-subpoblacional, se calcula:

$$F_{IS} = \frac{\overline{H_S} - H_I}{\overline{H_S}}$$

al nivel inter-subpoblacional, calculamos:

$$F_{ST} = \frac{H_T - \overline{H_S}}{H_T}$$

y al nivel metapoblacional, calculamos:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

Cuanto más difieran los tres índices de cero, más se alejará la metapoblación de una única población panmíctica.  $F_{IS}$  puede alcanzar valores positivos (déficit de heterocigotos), negativos (exceso de heterocigotos) o, simplemente cero cuando las subpoblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.  $F_{ST}$  expresa el índice de fijación y varía entre cero (si todas las subpoblaciones tienen las mismas frecuencias alélicas) y uno (si las subpoblaciones están fijadas para alelos diferentes). Este índice es inversamente proporcional al número de emigrantes entre subpoblaciones por generación, ya que el flujo génico entre éstas se opone fuertemente al aumento de la divergencia genética entre ellas (Cabrero *et al.*, 2 002).

## **2.10 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)**

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) obtiene valores estimados de los componentes de la variabilidad total y valores análogos a los estadísticos F, designados en este caso estadísticos  $\phi$ , que reflejan la correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica. Este método es suficientemente flexible como para trabajar con diversos tipos de matrices de entrada, correspondientes a diferentes tipos de datos moleculares, así como diferentes tipos de suposiciones evolutivas, sin modificar la estructura básica del análisis. La significancia de los componentes de la variabilidad y los estadísticos  $\phi$  es probada usando un enfoque permutacional, eliminando la asunción de normalidad que es convencional en los análisis de varianza pero inapropiado para los datos moleculares (Excoffier *et al.*, 1992).

AMOVA es hoy en día muy utilizado para la subdivisión de la variabilidad genética. Para marcadores dominantes de ADN, se calcula una matriz de distancia fenotípica para todas las comparaciones a pares usando distancias Euclidianas al cuadrado, generalmente. Los valores  $G_{ST}$  de Nei y  $\phi_{ST}$  de AMOVA son usualmente muy similares cuando son calculados en el mismo conjunto de datos (Nybom, 2004).

## **2.11 Diversidad genética y conservación**

La extensión y distribución de la diversidad genética en las especies es de importancia fundamental para su potencial evolutivo y determina sus posibilidades de sobrevivir. La evaluación de la variabilidad genética es por lo tanto, una pieza clave para el desarrollo de efectivas estrategias de conservación. En el Convenio de Diversidad Biológica de 1992 (Rio de Janeiro, Brasil), la variabilidad intraespecífica ha sido aceptada como uno de los

enfoques para la conservación, consistente con el objetivo general de mantener el potencial evolutivo de las especies (Newton *et al.*, 1999).

Es generalmente aceptado que la variación genética en poblaciones vegetales es estructurada en tiempo y espacio. La descripción del alcance y distribución de los diferentes aspectos de la diversidad genética en las especies, y de la manera cómo está estructurada, es un prerequisite esencial para determinar qué se va a conservar, dónde y cómo se va a conservar. El desarrollo de mejores esfuerzos de conservación implica no solo la descripción de la variación observada, sino también la identificación de los principales factores que probablemente afecten la estructura genética de las poblaciones vegetales y la determinación del efecto que ellos tienen en la cantidad de variación en una población y la distribución de alelos en ella. Tales factores incluyen a los climáticos, edáficos y bióticos, así como aquellos específicos de las poblaciones (p.e. tamaño poblacional o selección) o las especies (p.e. ploidía o sistema de apareamiento) (Rao *et al.*, 2002).

La tara es una especie que mantiene muchas interacciones con otros organismos, su propia biología depende de estas interacciones, tanto en procesos reproductivos como de estabilidad poblacional y dispersión. El no entendimiento de estas interacciones puede ocasionar el fracaso de los sistemas de conservación y producción. Los posibles impactos humanos por pastoreo, recolección silvestre y otras actividades se evidencian en las características poblacionales de la tara. Se entiende que para el caso actual del Perú, la recolección silvestre es y será una actividad importante y, por tanto, se deben conocer detalles de su dinámica poblacional. Saber la situación actual en los procesos de nacimiento y mortalidad es elemental al momento de definir técnicas sustentables de recolección, las cuales deberán llevarse a cabo mediante propuestas regionales. Por otro lado, si se encontraran ya problemas en la estructura de las clases de edad, tamaño y

fenología, deberán plantearse criterios ambientales para la protección de estos sistemas naturales (Larrea, 2 010).

Para el caso de la tara, la procedencia de las semillas será determinante en la calidad ofertada de las plantaciones en cuanto a la concentración de taninos; pero, la búsqueda de esta oferta de calidad conlleva el riesgo de una mezcla genética que genere una pérdida de características de las poblaciones naturales. En ese sentido, un sistema de conservación y manejo de tara debe tener en cuenta la protección de la variabilidad genética entre las poblaciones naturales y además, debe promover la creación de mecanismos de protección y generación de bancos de genes a escala regional.

Se ha visto que *C. spinosa* es una especie dominante en el ecosistema “matorral seco”, por lo cual debe promoverse el cultivo de esta planta en sectores con gran deterioro de la cobertura vegetal. Esta es una condición casi generalizada en Perú y la región, sobre todo por el gran deterioro que hay en zonas donde antes existía el ecosistema de “matorral seco”. Pero esta manera de promoverse debe estar vinculada con procesos de diversificación productiva para fortalecer la funcionalidad futura del sistema de cultivo y la mejora ambiental. Por tanto, el cultivo monoespecífico es una etapa inicial y parte de una dinámica productiva que favorecerá la conservación y la producción. (Larrea, 2 010)

El manejo en plantaciones es todavía muy incipiente en la mayoría de lugares de la región. La experiencia peruana es un valioso aporte, pero está muy ligada netamente a temas productivos. Es necesaria la inclusión del tema ambiental, con lo que se fortalecerán procesos de certificación, buen manejo y respeto ambiental. (Larrea, 2 010).

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

Existe diversidad genética interpoblacional e intrapoblacional en las muestras de *Caesalpinia spinosa*, la cuál puede ser evaluada mediante marcadores morfométricos de frutos y marcadores moleculares RAPD.

#### 3.2 Objetivos

##### 3.2.1 Objetivo general

Evaluar la diversidad genética de *Caesalpinia spinosa* mediante el análisis morfométrico de sus frutos y la identificación de marcadores moleculares (RAPD) a partir de muestras de tres poblaciones procedentes de Cajamarca, Junín y Ayacucho respectivamente.

##### 3.2.2 Objetivos específicos

- Identificar marcadores moleculares polimórficos adecuados para la evaluación de la diversidad genética de *Caesalpinia spinosa*.
- Identificar marcadores morfométricos mediante el análisis de los frutos de *Caesalpinia spinosa*.
- Evaluar la diversidad genética interpoblacional e intrapoblacional de las muestras de *Caesalpinia spinosa* basada en el polimorfismo de los marcadores moleculares.
- Evaluar la diversidad genética interpoblacional e intrapoblacional de las muestras de *Caesalpinia spinosa* basada en el polimorfismo de los marcadores morfométricos de sus frutos.
- Determinar la presencia de poblaciones genéticamente diferentes sobre la base de los datos brindados por los marcadores moleculares (RAPD).



- Determinar la presencia de poblaciones genéticamente diferentes sobre la base de los datos brindados por los marcadores morfométricos de los frutos.
- Determinar la relación directa entre marcadores moleculares RAPD y morfométricos de los frutos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Áreas de estudio

Se realizó el muestreo de individuos de *C. spinosa* en las regiones de Cajamarca, Junín y Ayacucho (Figura 4), con un total de 6 individuos por cada población (Tabla 3).

**Tabla 3.** Poblaciones de estudio.

Región	Provincia	Distrito	Nro. de árboles muestreados
Cajamarca	Cajabamba	Cajabamba	6
Junín	Tarma	Tarma	6
Ayacucho	Huamanga	Pacaycasa	6

Las ubicaciones exactas de las zonas de muestreo se observan en la Tabla 4. Las poblaciones se encuentran entre los 2 100 y 2 900 m.s.n.m. y la distancia aproximada entre la población de Cajamarca y la de Junín es de 501,43 km; mientras que la distancia aproximada entre las poblaciones de Junín y Ayacucho es de 246,12 km (Figura 4). Las tres poblaciones muestreadas se encontraban fuera de áreas de cultivo, sin sistemas de riego, poda o algún tipo de manejo.

**Tabla 4.** Coordenadas y altitud promedio de las zonas de muestreo de *Caesalpinia spinosa*.

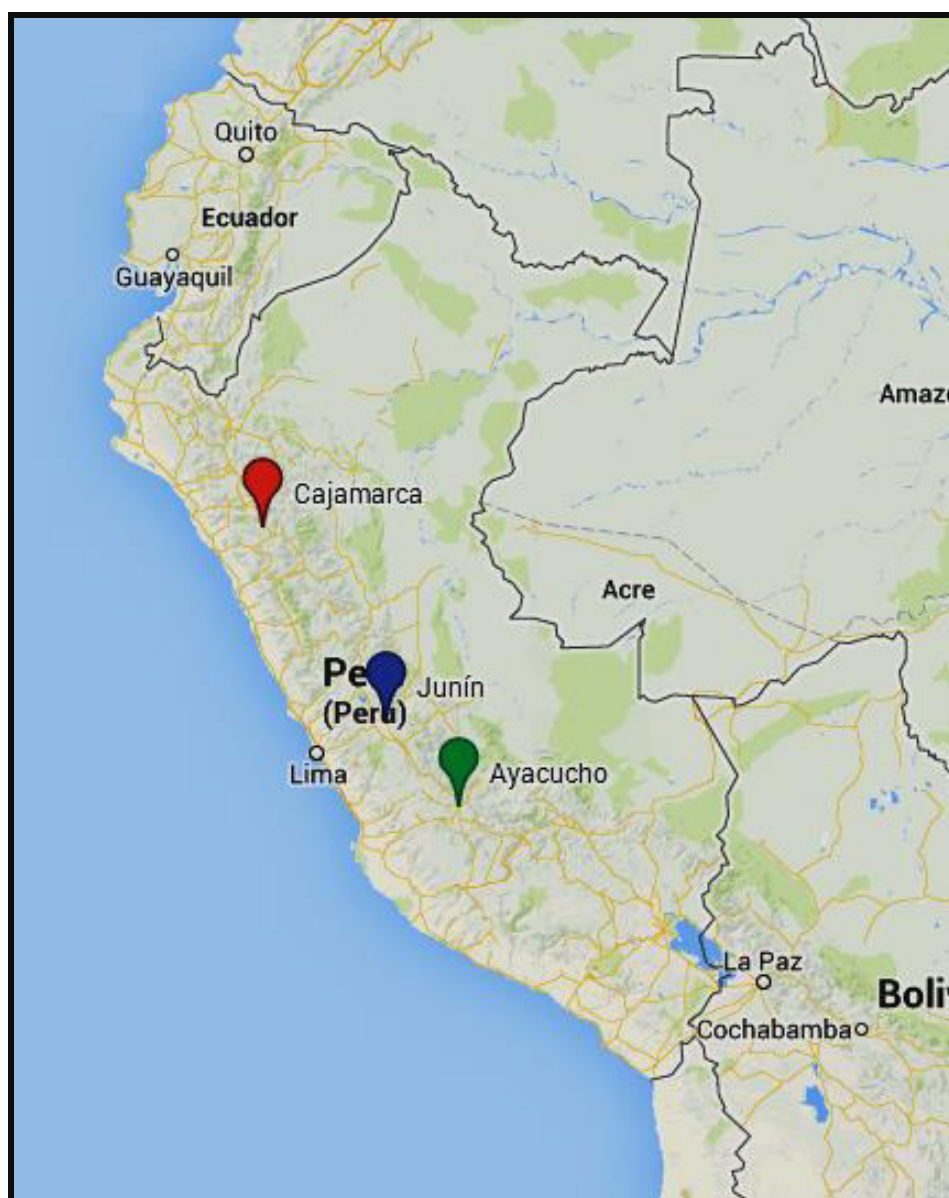
	Coordenadas		Altitud (m.s.n.m.)
	Latitud	Longitud	
Cajabamba (Cajamarca)	07° 34,831'	78° 08,074'	2 140
Tarma (Junín)	11° 23,564'	75° 41,515'	2 855
Pacaycasa (Ayacucho)	13° 4,816'	74° 13,576'	2 467

*Población de Cajamarca:* La zona de muestreo se ubica aproximadamente a la altura del kilómetro 15,8 de la carretera Cajabamba – San Marcos, en el Valle de Condebamba, distrito de Cajabamba (Figura 5).

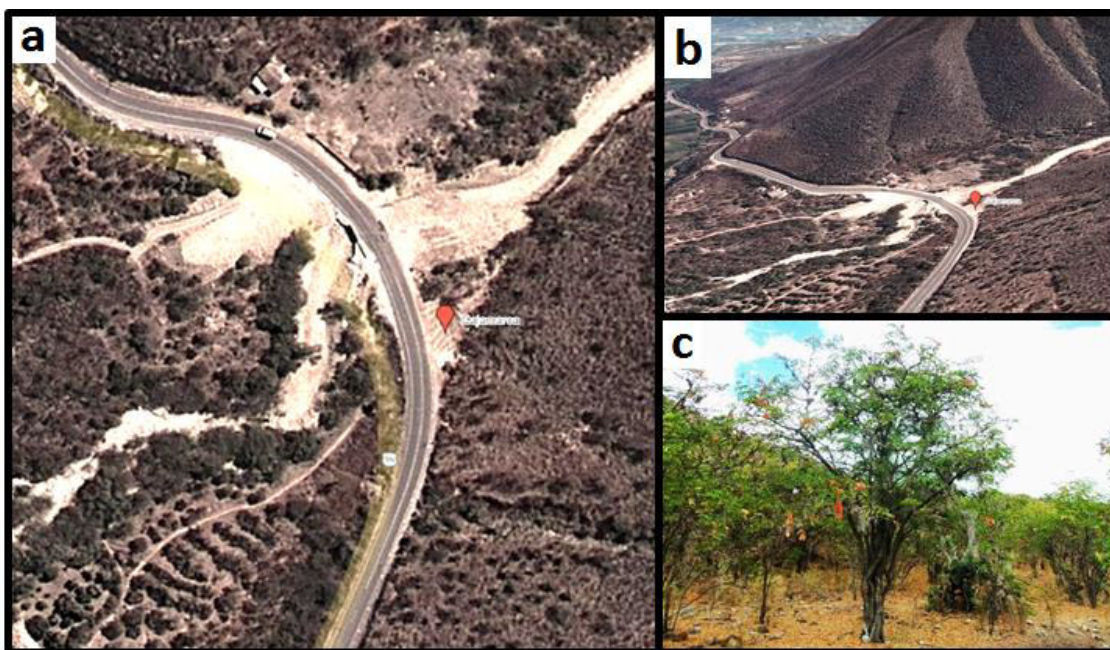
*Población de Junín:* La zona de muestreo se ubica a lo largo de la carretera afirmada de Tarma – Jacahuasi, aproximadamente entre los kilómetros 1,5 y 2,2, en el centro poblado de Ninatambo, distrito de Tarma (Figura 6).

*Población de Ayacucho:* La zona de muestreo se ubica aproximadamente a la altura del kilómetro 15,3 de la carretera Ayacucho – Huanta, en el centro poblado de Lagunilla, distrito de Pacaycasa (Figura 7).

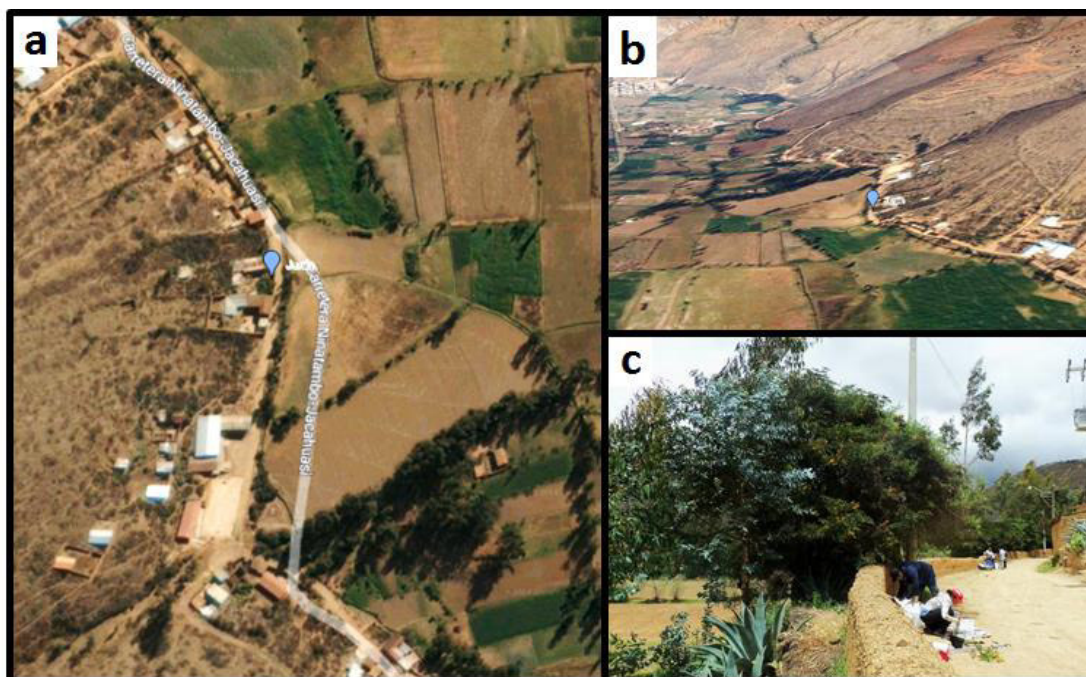
**Figura 4.** Mapa de localización de las tres poblaciones estudiadas de *Caesalpinia spinosa*.



**Figura 5.** Zona de muestreo de la población de Cajamarca. (a) Vista satelital normal y (b) vista satelital “a vuelo de pájaro”, tomadas de Google Maps (Google Inc.). (c) Fotografía de árboles muestreados en la zona (Foto: Alberto López).

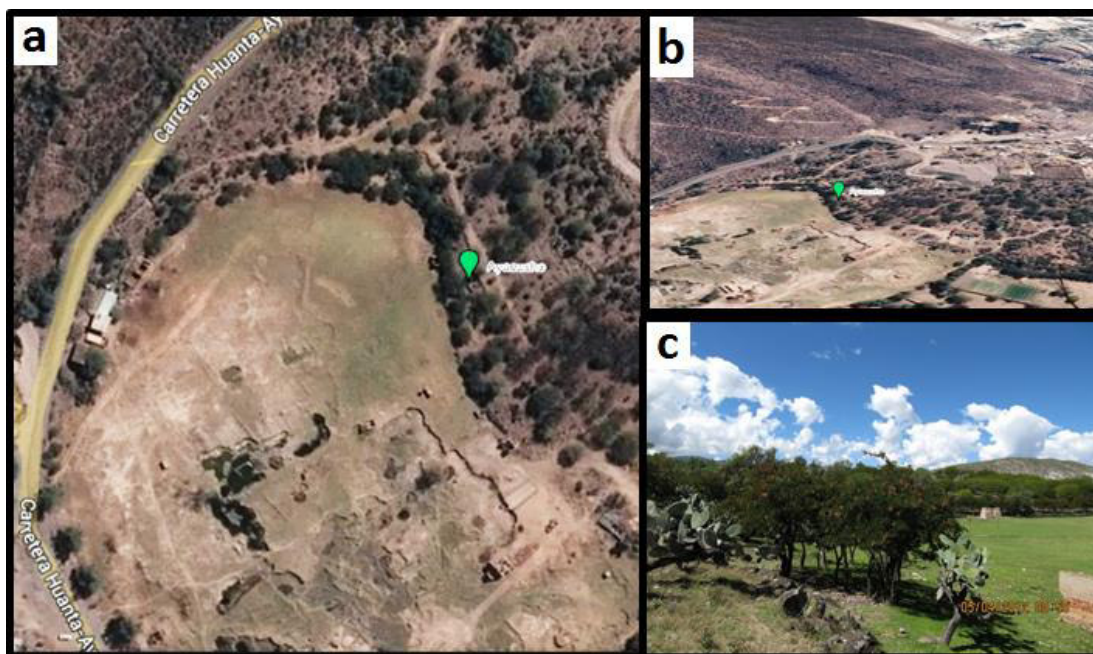


**Figura 6.** Zona de muestreo de la población de Junín. (a) Vista satelital normal y (b) vista satelital “a vuelo de pájaro”, tomadas de Google Maps (Google Inc.). (c) Fotografía de árboles muestreados en la zona (Foto: Alberto López).





**Figura 7.** Zona de muestreo de la población de Ayacucho. (a) Vista satelital normal y (b) vista satelital “a vuelo de pájaro”, tomadas de Google Maps (Google Inc.). (c) Fotografía de árboles muestreados en la zona (Foto: Alberto López).



## 4.2 Colecta

Las colectas se realizaron en meses diferentes; así tenemos que la colecta en la población de Junín se realizó durante la última semana del mes de marzo, en la población de Ayacucho se realizó en el mes de mayo y en la población de Cajamarca en el mes de agosto, durante el año 2012.

Para realizar los estudios morfológicos se colectaron un total de 15 frutos maduros de cada árbol, eligiéndose aquellas vainas más rojizas y secas. Para los estudios de marcadores moleculares se colectaron foliolulos jóvenes de cada individuo, los cuales fueron tomados a partir de hojas jóvenes, eligiéndose aquellas de color verde claro y tamaño pequeño, que son características de brotes de brotes recientes.

### 4.3 Transporte de muestras y lugar de estudio

Las muestras de frutos fueron almacenadas directamente en campo, en bolsas de papel craft las cuales a su vez se introdujeron en bolsas de cierre hermético (“ziploc”). Las bolsas con frutos se introdujeron en cajas de cartón y así fueron transportadas a Lima. Los análisis morfométricos se realizaron en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Las muestras de hojas jóvenes de tara fueron colectadas y almacenadas directamente en bolsas de cierre hermético que contenían sílica gel naranja (no tóxica) de la marca Merck (Figura 8). Las bolsas se introdujeron en una caja de cartón y así fueron transportadas a Lima. Los análisis moleculares se realizaron en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.



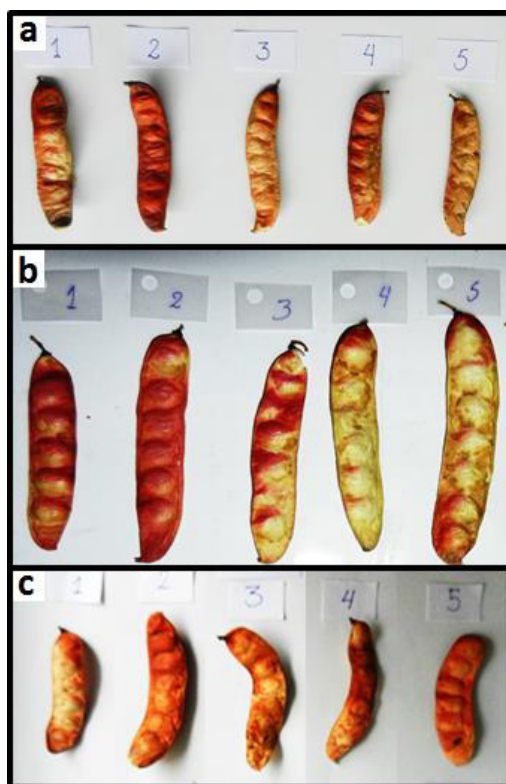
**Figura 8.** Colecta de hojas de *C. spinosa* para la extracción de ADN. (a) Elección de hojas jóvenes en campo. (b) Almacenamiento de hojas en bolsas de cierre hermético con sílica gel (no tóxica) para el secado de la muestra hasta su procesamiento. (Fotos: Alberto López).

Se depositó una muestra botánica herborizada de cada población en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con números de depósito USM 260515 (Cajamarca), USM 260516 (Junín) y USM 2734548 (Ayacucho).

#### 4.4 Análisis morfológico

Se realizó el análisis morfométrico de 15 frutos por cada individuo, en un total de 6 individuos por cada población, en un total de 3 poblaciones, sumando un total de 270 frutos (Figura 9). Las variables medidas fueron: diámetro mayor de semilla central, peso de semilla central, número de semillas por vaina, largo de vaina, ancho de vaina y peso de vaina con semillas.

**Figura 9.** Frutos de *Caesalpinia spinosa*. (a) Frutos del árbol T1 correspondiente a la población de Junín. (b) Frutos del árbol T10 correspondiente a la población de Ayacucho. (c) Frutos del árbol T18 correspondiente a la población de Cajamarca. (Fotos: Yajahaira Carbajal).



Las variables se midieron directamente sobre los frutos. El diámetro mayor de semilla central se midió utilizando un vernier; el peso de vaina con semillas y el peso de semilla central se midieron con una balanza de 2 decimales; cuando se encontraban vainas con números pares de semillas, se pesaba al azar una de las semillas del medio; el largo de vaina se midió con una regla milimetrada y, para el caso de vainas curvas, se utilizó pabilo para cubrir la longitud total; el ancho de vaina se midió con una regla milimetrada y finalmente se contó el número de semillas por vaina, incluyendo aquellas semillas poco desarrolladas.

Los datos obtenidos fueron organizados en una Matriz Básica de Datos (MBD) utilizando el programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc.), en el cual se realizó el Análisis de Componentes Principales (ACP) y el Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas (AFDC).

## **4.5 Análisis molecular**

### ***4.5.1 Extracción de ADN***

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras de hojas jóvenes de tara. Como primer paso se pesó entre 17,5 y 19,5 mg de hojas secas. Seguidamente el material fue congelado en nitrógeno líquido y triturado en tubos eppendorf de 2 ml, con la ayuda de baguetas de vidrio. Una vez que las muestras estuvieron trituradas al máximo posible, se inició la extracción de ADN, para lo cual se utilizó el kit comercial DNeasy<sup>®</sup>, siguiendo el protocolo DNeasy Plant Mini detallado en el kit. El protocolo de extracción se realizó sin modificaciones (Figura 10).



La verificación de la calidad y cantidad de ADN fue realizada en geles de agarosa al 0,8%. La concentración fue estimada comparando la intensidad de luminiscencia entre las muestras y el marcador Lambda DNA-Hind III Digest.

**Figura 10.** Proceso de extracción de ADN de muestras de *Caesalpinia spinosa* procedentes de las poblaciones de Junín, Ayacucho y Cajamarca (Foto: Diego Orihuela).



#### 4.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y obtención de marcadores RAPD

Para el ensayo de PCR se utilizó el kit Multiplex de la empresa Qiagen y los cebadores comerciales Qiagen Operon (Tabla 5). Las condiciones de amplificación de ADN fueron estandarizadas en el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria, las cuales consistieron en un volumen total de reacción de 15 µl con aproximadamente 60 ng de ADN, 7,5 µl de buffer de PCR 2X (Taq pol., dNTPs), 1,5 µl de cada cebador a una concentración de trabajo de 100 µM.

**Tabla 5.** Código y secuencia de cada uno de los cebadores utilizados en las reacciones PCR para la obtención de marcadores RAPD.

Cebador	Secuencia
OPI-01	5'-ACCTGGACAC-3'
OPI-04	5'-CCGCCTAGTC-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'

Para la obtención de marcadores RAPD, cada muestra fue sometida a 5 reacciones de PCR, usando un cebador por cada reacción. Los ciclos de amplificación se estandarizaron en base a los datos de Fontanetti *et al.* (2012) y fueron: un ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 2 minutos (denaturación), 34 °C por 1 minuto (*annealing*) y 72 °C por 2 minutos (extensión); un ciclo final a 72 °C por 10 minutos (extensión final). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler).

#### 4.5.3 Electroforesis de ADN

Con el total de la muestra amplificada en cada reacción de PCR se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, en la carga del gel se utilizó junto a las muestras amplificadas el marcador de peso molecular DNA Ladder 100 bp (New England BioLabs). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar las bandas de ADN que corresponden a los distintos *loci* amplificados, finalmente fueron fotografiados en luz ultravioleta mediante el uso de un transiluminador y un fotodocumentador.

#### 4.5.4 Análisis de loci amplificados

La comparación entre los genotipos se hizo mediante la similitud y diferencia de los patrones de bandas, asignándose el valor 0 a la ausencia y 1 a la presencia de una

banda. Se cuantificó el número de bandas generadas en la amplificación para cada cebador, ordenándolas de mayor a menor tamaño. El número de bandas totales por cada muestra se halló en el rango de 67 a 85, con excepción de la muestra T3 que presentó un total de 45 bandas, razón por la cual fue excluida de los análisis estadísticos de diversidad genética ya que alteraría los resultados debido a su alta divergencia. Se realizó el registro de los marcadores RAPD obtenidos con los 5 cebadores, sumando un total de 104 *loci*. Con esta información se construyó la Matriz Básica de Datos (MBD) en Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation).

#### 4.5.5 Análisis estadístico y evaluación de la diversidad genética

La evaluación de la diversidad genética de las poblaciones de tara se realizó mediante la determinación de *loci* polimórficos y el uso de los valores de  $N_e$  (número efectivo de alelos),  $H_e$  (heterocigosidad esperada, diversidad genética de Nei) e  $I$  (índice de información de Shannon), los cuales fueron determinados con el programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

El análisis de agrupamientos o *clusters* se desarrolló con el programa FreeTree versión 0.9.1.50 (Pavlicek *et al.*, 1999), en el cual se generó una matriz de similitud con el coeficiente de Jaccard, a partir de la cual se construyeron dos dendogramas, uno con el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) y otro con el algoritmo NJ (*Neighbor Joining*). En ambos casos, se aplicó el método de remuestreo *bootstrap*, con un total de 1 000 repeticiones. El dendograma generado fue editado gráficamente con el programa FIGTREE v1.4 (Rambaut, 2012).

Para la evaluación de la estructura genética de las poblaciones se calculó el índice  $\phi_{ST}$  a pares y se aplicó un AMOVA (Análisis Molecular de Varianza), mediante el programa ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2011).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis de diversidad genética basada en características morfológicas del fruto

#### 5.1.1 Descripción de datos morfológicos

Se obtuvo las medidas de las 6 variables para 18 individuos de *Caesalpinia spinosa*, cada dato se registró a partir de cada uno de los 15 frutos (vainas) colectados por individuo, generándose un total de 270 datos o casos.

La Tabla 6 muestra cinco valores de referencia medidos para cada variable por población. Se puede ver que las medias del ancho de vaina de las poblaciones de Junín y Cajamarca ( $1,97 \pm 0,26$  cm y  $1,98 \pm 0,21$  cm, respectivamente) presentan valores aproximados y mayores que la de la población de Ayacucho ( $1,90 \pm 0,14$  cm), mientras que las medias del largo de vaina son mayores en las poblaciones de Cajamarca y Ayacucho ( $9,61 \pm 0,84$  cm y  $9,66 \pm 1,09$  cm, respectivamente) que en la de Junín ( $8,76 \pm 1,33$  cm). Además, la media del peso de vaina con semillas es mayor en Junín y Ayacucho ( $2,72 \pm 0,87$  g y  $2,78 \pm 0,56$  g, respectivamente) que en Cajamarca ( $2,50 \pm 0,55$  g).

Los valores de CV (coeficiente de variación), como medida relativa de la variación de cada carácter estudiado, nos muestran que la variable peso de semilla central tiene la mayor diversidad o variabilidad en las tres poblaciones, encontrándose en Junín y Cajamarca valores de variabilidad extrema (CV mayor que 100%); por otro lado, se puede notar que el largo de vaina posee la menor variabilidad en las 3 poblaciones (CV menor que 14%).

**Tabla 6.** Valores mínimo, máximo, media, desviación estándar y CV (coeficiente de variación) para 7 variables medidas en 18 individuos de *Caesalpinia spinosa*.

JUNÍN	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	*CV (%)
Diámetro mayor de semilla central	0,70	1,20	0,91	0,12	37,21
Peso de semilla central	0,02	0,50	0,17	0,08	172,52
Número de semillas por vaina	3,00	7,00	5,46	0,98	18,19
Largo de vaina	5,80	1,30	8,76	1,33	13,16
Ancho de vaina	1,20	2,70	1,97	0,26	25,76
Peso de vaina con semillas	1,30	4,89	2,72	0,87	34,36
AYACUCHO	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	*CV (%)
Diámetro mayor de semilla central	0,70	1,20	0,98	0,08	29,12
Peso de semilla central	0,07	0,32	0,22	0,04	86,73
Número de semillas por vaina	3,00	8,00	5,69	0,98	17,39
Largo de vaina	7,60	11,50	9,61	0,84	9,51
Ancho de vaina	1,60	2,20	1,90	0,14	19,78
Peso de vaina con semillas	1,45	3,98	2,78	0,56	26,88
CAJAMARCA	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	*CV (%)
Diámetro mayor de semilla central	0,60	1,20	0,94	0,12	36,54
Peso de semilla central	0,04	0,28	0,18	0,05	128,43
Número de semillas por vaina	2,00	7,00	5,00	1,23	22,18
Largo de vaina	6,70	13,30	9,66	1,09	10,82
Ancho de vaina	1,70	2,80	1,98	0,21	22,90
Peso de vaina con semillas	1,59	4,01	2,50	0,55	29,59

\*Coeficiente de variación:  $CV = \frac{\sqrt{DE}}{media}$ , donde DE = desviación estándar.

### 5.1.2 Análisis de Componentes Principales (ACP)

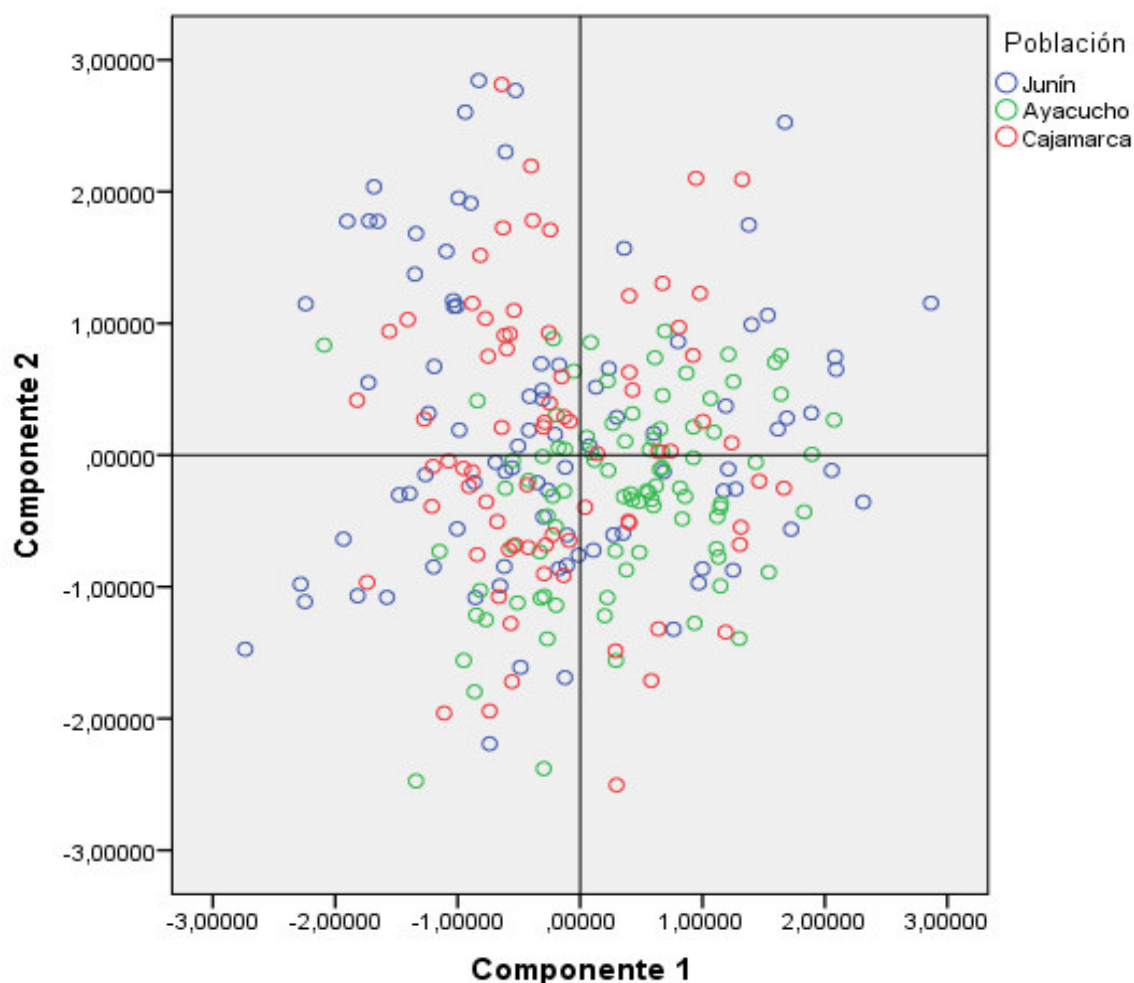
Este análisis multivariado permitió reducir el número de variables a 2 componentes principales que explican en conjunto el 64,19% de la variación total. Como se puede apreciar en la Tabla 7, el componente 1 explica la mayor parte de la variabilidad (45,33%) y dentro de este componente la variable que contribuye más a la diversidad es el peso de vaina con semillas (0,905), relacionada con la masa del fruto. En el componente 2, la de mayor contribución a la variabilidad es el diámetro mayor de semilla central (-0,642), relacionada con el tamaño de las semillas.

**Tabla 7.** Componentes extraídos y porcentaje de variabilidad explicada por cada uno de ellos a partir del análisis de componentes principales. Cada variable posee un coeficiente asociado a cada componente cuyo valor absoluto representa su contribución a la variabilidad hallada.

Variable	Componente	
	1	2
Diámetro mayor de semilla central	0,624	-0,642
Peso de semilla central	0,739	-0,495
Número de semillas por vaina	0,490	0,317
Largo de vaina	0,702	0,315
Ancho de vaina	0,481	0,498
Peso de vaina con semillas	0,905	0,167
Variabilidad explicada	45,33%	18,87%

La representación gráfica del Análisis de componentes principales (Figura 11) muestra que la diferenciación de las tres poblaciones basada en los dos componentes resulta difícil de determinar, ya que los valores no tienden a formar grupos separados. En la componente 2 se observa que las poblaciones de Cajamarca y Junín poseen una gran variabilidad fenotípica, mientras que la población de Ayacucho posee una variabilidad menos amplia. Debido a que se observa una mayor cantidad de casos de esta población en el extremo negativo de la Componente 2 (parte inferior del gráfico), se puede inferir que la población de Ayacucho se caracteriza por poseer semillas de gran tamaño (diámetro), con poca presencia de semillas pequeñas, a diferencia de las poblaciones de Junín y Cajamarca que poseen semillas tanto grandes como pequeñas. Adicionalmente, se puede ver que en el cuadrante IV (inferior derecho) existe una mayor cantidad de representantes de la población de Ayacucho, lo cual implica una mayor presencia de frutos con alto peso y gran diámetro de semillas, a diferencia de las otras poblaciones.

**Figura 11.** Diagrama de dispersión del Análisis de componentes principales. Los valores se ubican en un sistema de coordenadas que tiene como ejes a las componentes 1 y 2, que explican el mayor porcentaje de variabilidad.



### 5.1.3 Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas (AFDC)

Este análisis es también un tipo de análisis multivariado, pero a diferencia del Análisis de componentes principales, este se caracteriza por maximizar la variación interpoblacional y minimizar la variación intrapoblacional en poblaciones asignadas *a priori*, con el objetivo de lograr una mejor discriminación de éstas.

El análisis generó dos funciones, las cuales asignan un coeficiente determinado a cada variable, cuyo valor se relaciona con la contribución que haga ésta a la variabilidad (Tabla

8). Nótese que solo se han incluido 4 de las 6 variables, esto debido a que en el análisis discriminante pueden excluirse variables con el fin de maximizar la variación interpoblacional y minimizar la intrapoblacional. En la función 1 se observa que las variables con mayor contribución a la variabilidad son el peso de vaina con semillas (-1,252) y el largo de vaina (1,205). En la función 2 las de mayor contribución son el peso de vaina con semillas (-0,900) y el ancho de vaina (-0,757). En ambas funciones las variables que más contribuyen a la variabilidad están relacionadas con características de la vaina.

**Tabla 8.** Funciones canónicas y porcentaje de variabilidad explicada por cada una de ellas a partir del Análisis de funciones discriminantes canónicas. Cada variable posee un coeficiente asociado a cada función cuyo valor absoluto representa su contribución a la variabilidad hallada.

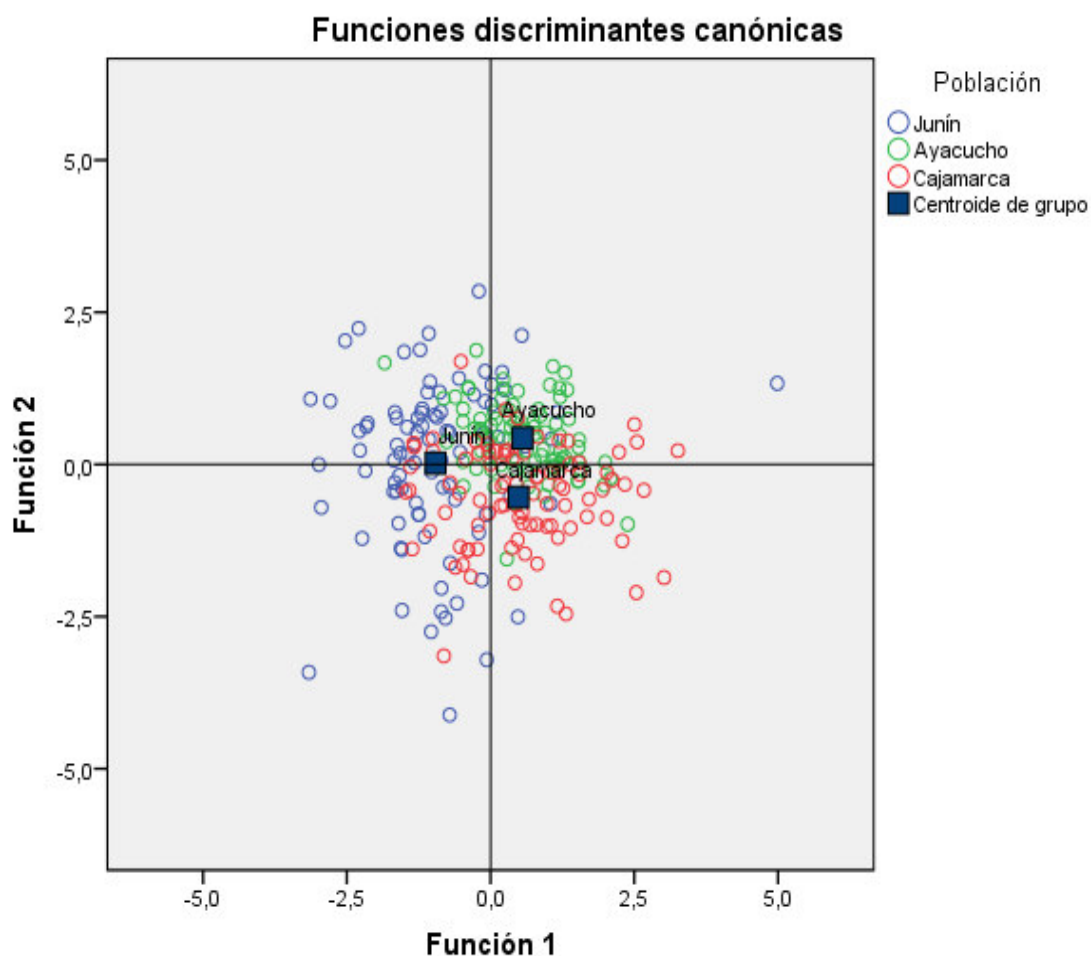
Variables	Función	
	1	2
Peso de semilla central	0,776	0,390
Largo de vaina	1,205	-0,323
Ancho de vaina	-0,164	-0,757
Peso de vaina con semillas	-1,252	0,900
Variabilidad explicada	76,90%	23,10%

La representación gráfica del análisis discriminante (Figura 12) muestra que la Función 1 discrimina a la población de Junín, la cual posee una mayor frecuencia de frutos con mayor peso y menor largo de vaina que los de las poblaciones de Ayacucho y Cajamarca, las cuales poseen, en este sentido, frutos con características similares entre sí. La función 2 discrimina mejor a las poblaciones de Ayacucho y Cajamarca: los frutos de Ayacucho son más pesados y menos anchos que los de Cajamarca, mientras que en Junín se encuentran frutos con medidas diversas para ambas características; no obstante, basándonos en las posiciones de los centroides podemos afirmar que los frutos de Junín son en promedio más pesados y menos anchos que los de Cajamarca, aunque estas



diferencias sean pequeñas. El patrón de distribución de puntos menos dispersos de la población de Ayacucho, sugiere una mayor homogeneidad en sus características en comparación con las otras dos poblaciones, lo cual favorece al mayor valor promedio en peso de fruto (2,78 g) que en Junín (2,72 g) (Tabla 6). Sin embargo, como se muestra en la representación gráfica, estas tres poblaciones de tara comparten características del fruto, lo cual impide que sean separadas o discriminadas totalmente.

**Figura 12.** Diagrama de dispersión del Análisis de funciones discriminantes canónicas. Los valores se ubican en un sistema de coordenadas que tiene como ejes a las funciones 1 y 2, que explican la variabilidad total.



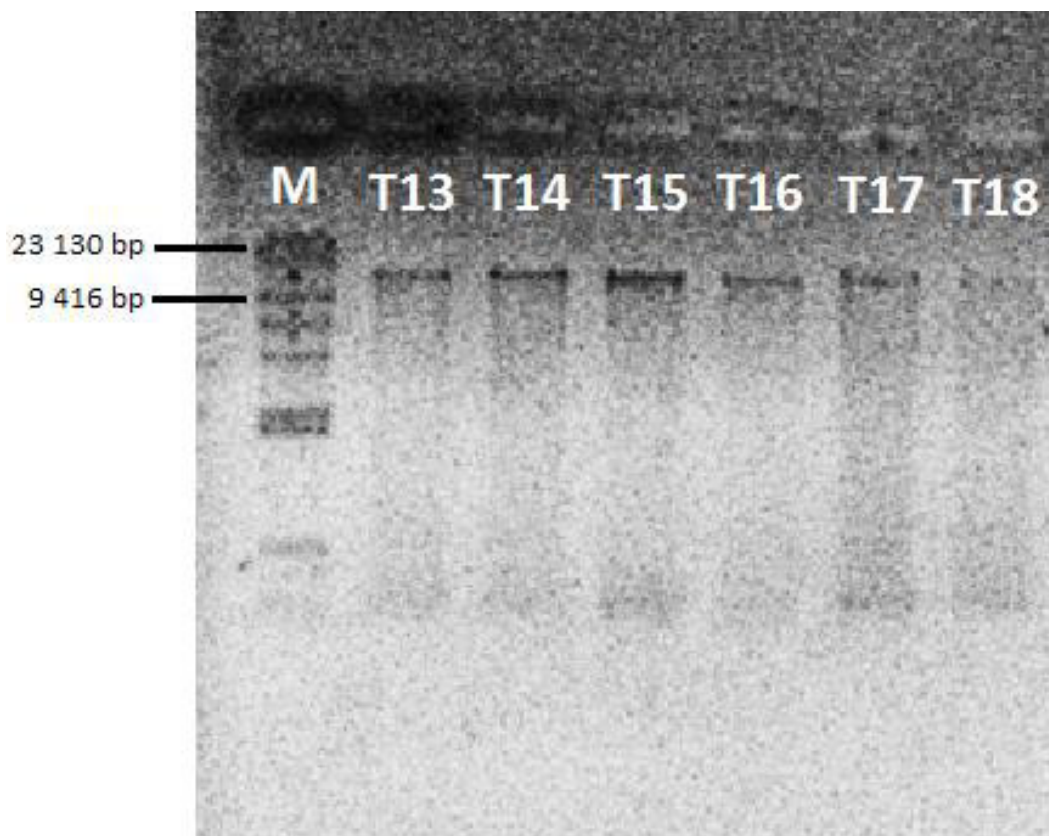
## 5.2 Análisis de la diversidad genética con base en marcadores RAPD

### 5.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de hojas jóvenes de tara, las cuales fueron previamente almacenadas en sílica gel. La extracción se realizó con el kit DNeasy® Plant Mini de Qiagen, sin modificaciones.

El ADN extraído fue visualizado en geles de agarosa al 0.8% (Figura 13), obteniéndose ADN genómico con un tamaño mayor a 9 416 bp y de buena calidad (sin problemas de fragmentación).

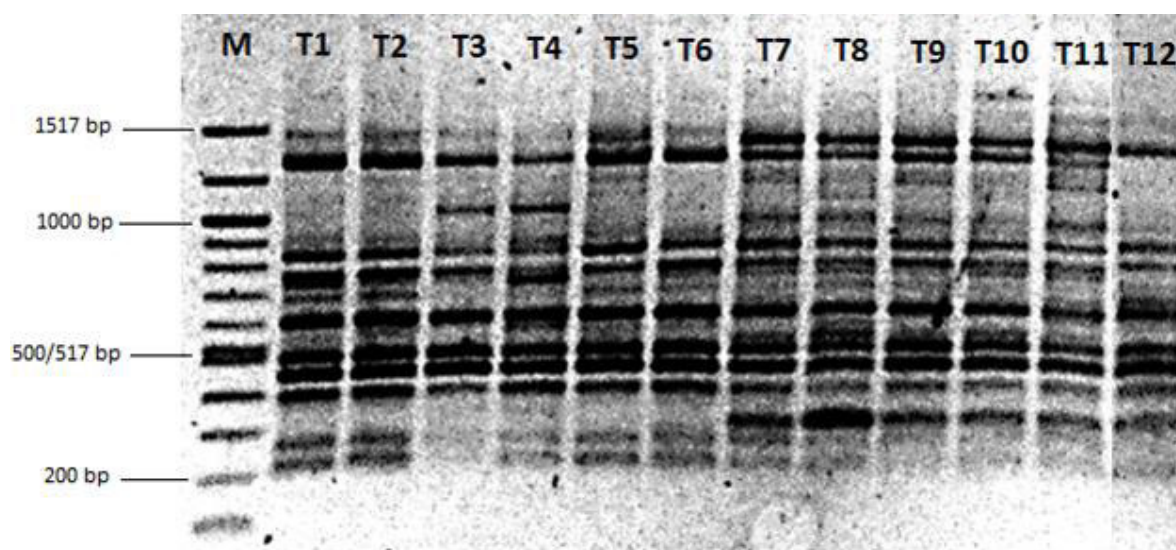
**Figura 13.** Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra el ADN extraído a partir de 6 individuos de *C. spinosa* de la población de Cajamarca (T13 – T18). El carril M corresponde al marcador de peso Lambda DNA-Hind III Digest.



### 5.2.2 Análisis de diversidad con marcadores RAPD

Se obtuvo un total de 104 *loci* mediante el uso de los 5 oligonucleótidos (cebadores) en la PCR (Figura 14). Como se puede ver en la Tabla 9, se obtuvo 73 *loci* polimórficos de un total de 104 *loci* amplificados (70,19%). De los 5 cebadores utilizados, OPA-12 es el que nos brindó mayor información al amplificar 24 *loci* polimórficos de un total de 25; por otro lado, OPI-01 fue el que brindó menos información, con 7 *loci* polimórficos de un total de 16.

**Figura 14.** Gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los fragmentos (*loci*) amplificados en individuos de Junín (T1 a T6) y Ayacucho (T7 a T11) con el cebador OPA-09. El carril M corresponde al marcador de peso molecular DNA Ladder 100 bp.



La población con mayor porcentaje de *loci* polimórficos fue Ayacucho (50%), a continuación está Junín (34,62%) y finalmente Cajamarca (28,85%). Estos resultados ya nos dan una idea general de la diversidad genética molecular, siendo la población de Ayacucho la más variable.

**Tabla 9.** Número de loci polimórficos detectados con 5 cebadores en 3 poblaciones de *Caesalpinia spinosa*.

Cebador	No. de loci	No. de loci polimórficos			No. total de loci polimórficos
		Junín	Ayacucho	Cajamarca	
OPA-09	26	9	13	5	19
OPA-12	25	15	18	12	24
OPA-15	13	3	5	5	10
OPI-01	16	1	6	4	7
OPI-04	24	8	10	4	13
<b>TOTAL</b>	<b>104</b>	<b>36</b>	<b>52</b>	<b>30</b>	<b>73</b>
	<b>% de polimorfismo</b>	<b>34.62</b>	<b>50.00</b>	<b>28.85</b>	<b>70.19</b>

A partir de los 104 *loci* se estimó la diversidad genética mediante los valores de número efectivo de alelos ( $N_e$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) e índice de información de Shannon ( $I$ ) (Tabla 10). El valor de  $N_e$  fue mayor en la población de Ayacucho (1.3619), seguido por Junín (1.2704), mientras que la población de Cajamarca presentó un valor menor (1.2146). El mismo perfil de variación se observa para los estimadores  $H_e$  e  $I$ , en los cuales Ayacucho posee los mayores valores. Esto indica que Ayacucho posee la mayor variabilidad genética entre las 3 poblaciones estudiadas.

**Tabla 10.** Estimación de la variabilidad genética en 3 poblaciones de *Caesalpinia spinosa* a partir de 104 productos de amplificación de ADN mediante el método RAPD.

Población	No. de loci polimórficos	% de loci polimórficos	$N_e^*$	$H_e^*$	$I^*$
Junín	36	34.62	$1.2704 \pm 0.4105$	$0.1452 \pm 0.2124$	$0.2089 \pm 0.2994$
Ayacucho	52	50.00	$1.3619 \pm 0.4113$	$0.2013 \pm 0.2171$	$0.2930 \pm 0.3081$
Cajamarca	30	28.85	$1.2146 \pm 0.3670$	$0.1183 \pm 0.1960$	$0.1713 \pm 0.2792$

\* $N_e$ : Número efectivo de alelos;  $H_e$ : Heterocigosidad esperada (diversidad genética de Nei);  $I$ : Índice de información de Shannon.

Adicionalmente, se calculó por segunda vez los estimadores de diversidad pero solo con el uso de los 73 *loci* polimórficos, cuyos resultados se pueden observar en la Tabla 11.

Con este nuevo análisis se obtuvo valores mayores para cada uno de los estimadores de diversidad; no obstante, la población de Ayacucho se mantuvo como la de mayor variabilidad.

**Tabla 11.** Estimación de la variabilidad genética en 3 poblaciones de *Caesalpinia spinosa* a partir de 76 productos de amplificación de ADN polimórficos mediante el método RAPD.

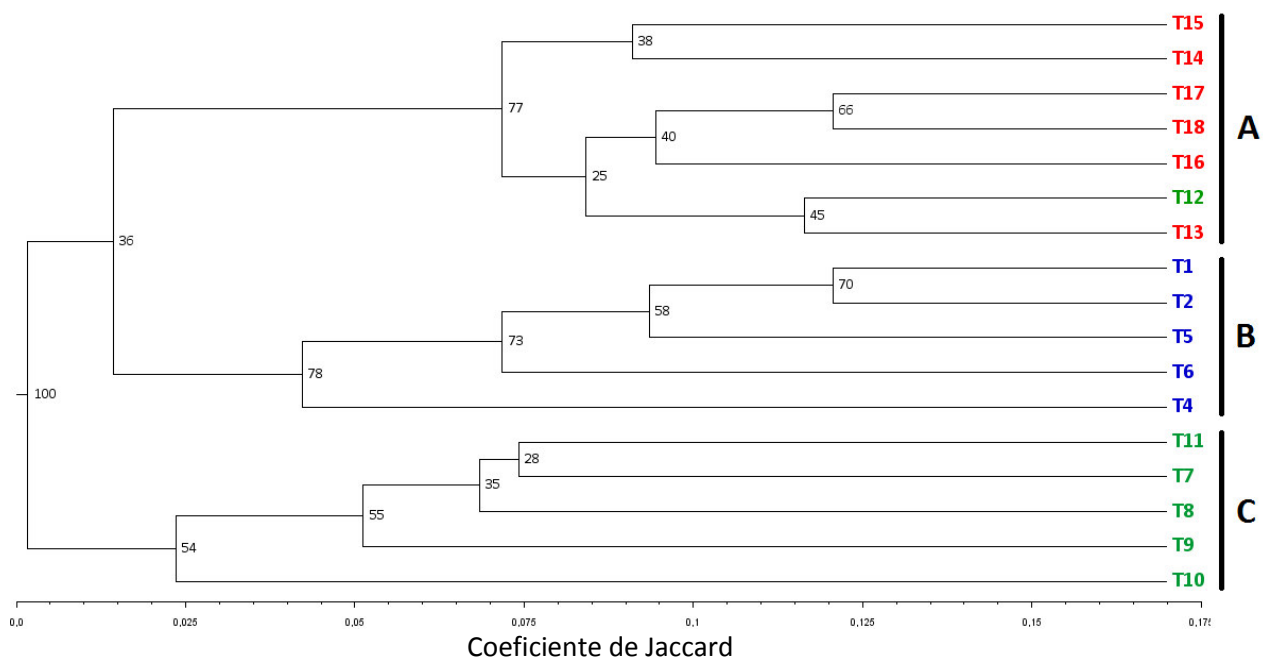
<i>Población</i>	<i>No. de loci polimórficos</i>	<i>% de loci polimórficos</i>	<i>Ne*</i>	<i>He*</i>	<i>I*</i>
Junín	36	34.62	1.3853 ± 0.4430	0.2069 ± 0.2271	0.2976 ± 0.3185
Ayacucho	52	50.00	1.5156 ± 0.4020	0.2868 ± 0.2063	0.4174 ± 0.2883
Cajamarca	30	28.85	1.3057 ± 0.4056	0.1686 ± 0.2153	0.2441 ± 0.3057

\*Ne: Número efectivo de alelos; He: Heterocigosidad esperada (diversidad genética de Nei); I: Índice de información de Shannon.

### 5.2.3 Análisis de agrupamientos (clusters)

Se realizó un análisis de agrupamiento (*clusters*) para generar un dendograma mediante el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), basado en el coeficiente de similaridad de Jaccard. La matriz de distancias se construyó a partir de los datos binarios (presencia/ausencia de bandas) obtenidos del análisis de los marcadores RAPD. El dendograma se muestra en la Figura 15, en la cual se señalan con un mismo color a individuos de una misma población.

**Figura 15.** Dendograma de 17 individuos pertenecientes a 3 poblaciones de *C. spinosa*, basado en el índice de similitud de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. En color azul los individuos de la población de Junín, en verde los de Ayacucho y en rojo los de Cajamarca.



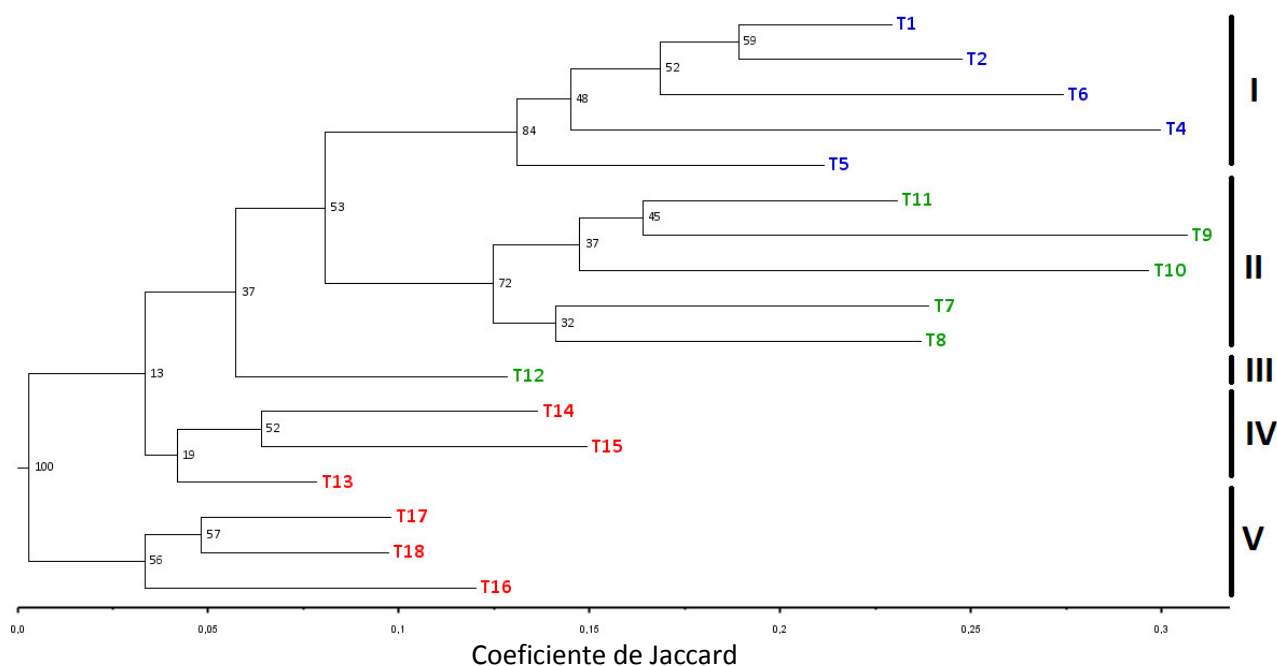
El dendograma muestra que todos los individuos de la población de Cajamarca conforman el grupo A, pero se incluye también en este grupo un individuo de la población de Ayacucho. En el grupo B quedan incluidos 5 individuos de la población de Junín, entre los cuales se observa distancias mayores a las del grupo A, lo cual evidencia una mayor diversidad en este grupo. El grupo C está conformado por 5 individuos de la población de Ayacucho y las distancias entre estos individuos son aún mayores que las del grupo B, sugiriendo una mayor variabilidad en este grupo. La divergencia entre el grupo C y los grupos A y B es soportada por un valor alto de *bootstrap* igual a 100%, la divergencia entre los grupos A y B posee un soporte más discreto (valor de *bootstrap* igual a 36%).

Adicionalmente, se realizó un segundo análisis de agrupamiento, esta vez mediante el método *Neighbor joining* (NJ) (Figura 16). Este análisis muestra agrupamientos diferentes a los obtenidos por el método UPGMA, sin embargo, permite establecer por lo menos dos

grupos, I y II, conformados por individuos de las poblaciones de Junín y Ayacucho respectivamente y soportados por un valor de *bootstrap* de 52%. Los individuos de Cajamarca y T12 (Ayacucho) se ubican en los grupos III, IV y V; T12 es el único integrante del grupo III, el grupo IV está conformado por individuos de la población de Cajamarca y es soportado por un valor de *bootstrap* bajo (13%), mientras que el grupo V diverge de los demás con un alto valor de *bootstrap* igual a 100% y está conformado por tres individuos de Cajamarca.

Como se observa en ambos análisis de agrupamiento (UPGMA y NJ), los individuos de Junín, Ayacucho y Cajamarca conforman grupos diferenciados genéticamente. No obstante, el árbol T12 de la población de Ayacucho no es considerado dentro del grupo ayacuchano, siendo más próximo a los grupos de Cajamarca.

**Figura 16.** Dendograma de 17 individuos pertenecientes a 3 poblaciones de *C. spinosa*, basado en el índice de similitud de Jaccard y el método de agrupamiento *Neighbor Joining*. En color azul los individuos de la población de Junín, en verde los de Ayacucho y en rojo los de Cajamarca.



#### 5.2.4 Análisis de estructura genética poblacional

Se realizó un análisis de estructura genética en las tres poblaciones estudiadas mediante el estadístico  $\phi_{ST}$ , el cual indica el grado de diferenciación entre las poblaciones y se puede interpretar como análogo del índice de fijación  $F_{ST}$  de Wright (Excoffier *et al.*, 1992), siendo los valores más cercanos a 1 los de mayor diferenciación. La Tabla 12 muestra los valores de  $\phi_{ST}$  entre las 3 poblaciones muestreadas, donde se puede ver que todos los valores son mayores que 0.3 y significativos, lo cual indica una diferenciación genética poblacional moderada. Las poblaciones de Ayacucho y Cajamarca aparecen claramente como las menos diferenciadas, lo cual se evidencia por la presencia de un individuo de Ayacucho (T12) dentro del grupo A del dendograma UPGMA, conformado en su mayoría por individuos de Cajamarca.

**Tabla 12.** Valores de  $\phi_{ST}$  entre las poblaciones de *Caesalpinia spinosa*. Todos los valores tuvieron un p-valor < 0.01.

	Junín	Ayacucho	Cajamarca
Junín	0.00000		
Ayacucho	0.38237	0.00000	
Cajamarca	0.45607	0.34720	0.00000

Así mismo, se realizó un análisis de estructura poblacional mediante Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Los resultados obtenidos (Tabla 13) indican que la variación dentro de las poblaciones explica la mayor parte de la variación total (63,71%), mientras que la variación entre poblaciones explica un 36,29%.

**Tabla 13.** Análisis molecular de varianza (AMOVA) aplicado a 3 poblaciones de *C. spinosa* en base a marcadores moleculares RAPD.

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2	82.016	5.69504	39.16
Dentro de las poblaciones	15	123.867	8.84762	60.84



## 6. DISCUSIÓN

La tara es una especie forestal andina presente en diversos países del norte, oeste y sur de Sudamérica, desde Venezuela hasta Argentina (Castell, 2012). De sus frutos y semillas se extraen diversas sustancias útiles, de las cuales los taninos y las gomas son las más usadas en la industria de cueros (curtiembre) y alimentos, respectivamente (Mancero, 2009). Debido a su prevalente estado silvestre, existe una variedad de plantas de acuerdo a las regiones y a las condiciones ambientales; así, se ha visto que el contenido de taninos puede variar desde un 30% a un 80% (Castell, 2012).

Se han sugerido diversos sistemas de producción de frutos de tara, cada uno de los cuales involucra un manejo especial y específico, que debe sustentarse en un conocimiento integral de la especie, es decir, que incluya características biológicas tales como su sistema reproductivo y los procesos de polinización, así como el estado de conservación de la especie (Narváez et al., 2009). Lamentablemente, no son muchos los estudios publicados de diversidad en *C. spinosa* de poblaciones peruanas, siendo algunos de ellos los realizados por Balaguer et al. (2011), quienes analizaron haplotipos de ADN cloroplastidial de 8 poblaciones peruanas y López et al. (2014), quienes hallaron diferencias morfológicas en los cariotipos de dos poblaciones de tara de Junín.

Una característica biológica importante es el rendimiento del fruto (vaina más semillas), ya que es la fuente a partir de la cual se extraen los taninos y las gomas. Villanueva (2007) menciona tres características comerciales del cultivar a establecer para el mercado agroindustrial, la primera de las cuales es la elección de los biotipos de tara que presenten rendimientos superiores o iguales a 46 kg de vainas por árbol por cada cosecha, la cual está relacionada directamente con el volumen y masa de la vaina. Con

esto, queda clara la gran importancia de las características del fruto en la producción y comercio de tara y sus derivados.

## **6.1 Evaluación de diversidad genética mediante análisis de caracteres morfológicos**

En este estudio se evaluó la diversidad genética mediante el uso de variables morfológicas relacionadas con el rendimiento del fruto (Tabla 6). De acuerdo con Franco *et al.* (2003), estos descriptores morfológicos quedarían clasificados como Morfoagronómicos, ya que son importantes desde el punto de vista de necesidades agronómicas, de mejoramiento genético y de mercadeo y consumo; además, se advierte que este tipo de caracteres, a pesar de que pueden tener una heredabilidad aceptable, pueden ser afectados por cambios ambientales.

Los resultados del análisis morfométrico de los frutos de las 3 poblaciones muestreadas de *C. spinosa* indican que existe una gran variabilidad en las características medidas. Dicha variabilidad puede ser observada mediante el Análisis de Componente Principales en la Figura 10, donde la dispersión de puntos para cada población es amplia y, para el caso de Cajamarca y Junín, muy semejante. Tales resultados permiten inferir que existen diferencias poco marcadas, sobre todo basadas en la distinta frecuencia de individuos con determinadas características en una población. Tal es el caso de la población de Ayacucho que posee una mayor presencia de individuos con semillas de diámetro grande, lo cual no implica la ausencia de semillas de diámetro pequeño, aunque no tan pequeño como las que sí pueden encontrarse en las poblaciones de Junín y Cajamarca; así mismo, en los individuos de Ayacucho se puede encontrar una mayor concentración de frutos con alto peso y amplio diámetro de semilla central, mientras que en las poblaciones de Cajamarca y Junín la variabilidad respecto a estas características es mayor, lo cual indica que la población de Ayacucho podría ser fenotípicamente más homogénea debido a

característica genotípicas o ambientales. En ese sentido, la heterogeneidad de los valores medidos es un rasgo común entre las 3 poblaciones y puede ser evidenciada también al examinar las desviaciones estándar y el CV de cada variable medida (Tabla 6).

En el análisis de funciones discriminantes canónicas se prescindió de las variables diámetro mayor de semilla central y número promedio de semillas con el fin de maximizar las diferencias interpoblacionales y minimizar las diferencias intrapoblacionales. Los resultados (Figura 11) muestran agrupaciones mejor definidas (menos dispersas) y diferenciadas. Sin embargo, a pesar de maximizar las diferencias interpoblacionales, todavía se observa cierto grado de solapamiento entre los valores de poblaciones diferentes, lo cual demuestra la existencia de grupos de vainas y semillas con características comunes entre las poblaciones.

Con los resultados de ambos análisis multivariados se establece que la población de Ayacucho se caracteriza por poseer frutos de gran peso y largo pero de poco ancho, además de semillas centrales con amplio diámetro mayor; la población de Cajamarca posee frutos de gran anchura y largo pero con poco peso, además de semillas centrales con corto diámetro mayor y la población de Junín posee frutos con gran peso, ancho mediano y longitud corta, además de semillas centrales con corto diámetro mayor.

Portal (2 010) realizó un estudio para establecer diferencias fenotípicas entre biotipos (cinco presuntos cultivares) de tara presentes en poblaciones silvestres de Ayacucho, en el cual utilizó, entre otras estructuras de la planta, los frutos y semillas, encontrando diferencias en el tamaño de las vainas y la forma de las semillas, las cuales se relacionan directamente con el cultivar al cual pertenecen. Además, vio que cada cultivar se desarrolla en un rango de altitud específico, entre los 2 480 y los 3 016 m.s.n.m. Las plantas muestreadas en el presente trabajo se encontraban a 2 467 m.s.n.m., con un rango de variación de  $\pm 10$  m, altitud muy próxima al rango en el cual se desarrolla el

cultivar “almidón gigante” (de 2 480 a 2 600 m.s.n.m.), que se caracteriza por poseer una de las vainas más largas y anchas entre los 5 cultivares. El promedio de largo de las vainas de Ayacucho fue de  $9,61 \pm 0,84$  cm, que correspondería a las vainas más largas de entre los 5 cultivares propuestos por Portal, pero además, son las vainas más largas y menos anchas de entre las tres poblaciones muestreadas. Desde esta perspectiva, los frutos de la población de Junín (2 855 m.s.n.m.) no cumplen con las características del cultivar correspondiente, “almidón gigante”, puesto que posee las vainas mucho menos largas que las de Ayacucho con las que debieran coincidir y los fruto de la población de Cajamarca (2 140 m.s.n.m.) no podrían ser clasificados, por encontrarse a una altitud muy por debajo del rango propuesto por Portal (2 010). Esto nos podría estar indicando que la diversidad morfológica de los frutos es mucho mayor que la detectada hasta la actualidad y que dependería no solo de la altitud, sino también de otras características ambientales como la temperatura, luz o irradiación solar, humedad relativa, suelo y requerimiento hídrico, como lo señala Villanueva (2 007).

Las vainas (despepitadas) representan aproximadamente el 62% del peso del fruto, en estas se concentra la mayor parte de los taninos (Campos, 2 010); por ende, las poblaciones cuyos individuos produzcan vainas más grandes y pesadas tienen una mayor importancia económica, ya que serían fuente de una mayor cantidad de taninos. Las semillas, que representan del 34 al 38% del peso del fruto (Castell *et al.*, 2 012), también tienen importancia económica: la cantidad de goma extraída representa aproximadamente el 5% del peso del total de semillas (Villanueva, 2 007), por lo cual es deseable la detección de poblaciones con semillas de gran peso y tamaño. De acuerdo a lo hallado en este estudio, la población de Ayacucho poseería las mejores características, ya que sus frutos son los más largos y pesados, y sus semillas las de mayor diámetro, lo que podría traducirse en un mayor rendimiento para la extracción de taninos y goma.

## 6.2 Evaluación de la diversidad genética mediante el análisis de marcadores moleculares RAPD

La obtención de marcadores moleculares mediante el método RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs* o DNA Polimórfico Amplificado al Azar) logra amplificar un número determinado de *loci* anónimos del genoma total de la especie en estudio. *Caesalpinia spinosa* es una planta de gran importancia económica y social en Perú, por lo que se necesita conocer la variabilidad genética que presentan sus poblaciones en las distintas regiones geográficas en las que se encuentran, puesto que es de ahí de donde nace la capacidad de la especie para adaptarse a cambios ambientales o desarrollar defensas contra plagas y patógenos; además, pueden existir características con base genética relacionadas a la producción (Narváez *et al.*, 2 009).

En Bolivia, con el liderazgo de BASFOR y en coordinación con el Centro de Investigación Agrícola (CRA) – Gembloux, se realizó una caracterización varietal de la tara mediante marcadores moleculares aplicando el método de RAPD. El estudio, si bien mostró como resultados variabilidad genética, sirve solo como primera referencia debido a que solo se tomaron en cuenta pocas muestras provenientes de Cochabamba y Santa Cruz (Mancero, 2009). En Ecuador, se determinó la variabilidad genética de cinco poblaciones naturales de tara distribuidas en la sierra ecuatoriana usando el método de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) y se incluyó 6 muestras de Perú. Los resultados indicaron que hay una independencia de los acervos genéticos de la tara en cuanto a su distribución geográfica sur–norte (Narváez *et al.*, 2 009).

La presente investigación encontró un gran nivel de diversidad genética. Los cinco cebadores empleados generaron un total de 104 productos amplificados (bandas), de los cuales 73 (70,19%) fueron polimórficos (Tabla 9) tanto a nivel intrapoblacional como interpoblacional. Resultados similares de polimorfismo se obtuvieron al hacer estudios de

variabilidad en otras especies de la familia Fabaceae, como por ejemplo en *Albizia lebbbeck* (81,6% de bandas polimórficas) (Aparajita *et al.*, 2 009), *Vigna subterranea* (68,4% de polimorfismo) (Runanoi *et al.*, 2012) y *Vigna umbellata* (72,8% de polimorfismo) (Muthusamy *et al.*, 2 008), por lo cual se concluye que la técnica de RAPD es eficiente para determinar la variabilidad molecular intraespecífica en *Caesalpinia spinosa*, así como en otras especies de la misma familia.

Los resultados de porcentaje de *loci* polimórficos dan una idea inicial de la diversidad de las diferentes poblaciones, siendo Ayacucho la población con mayor diversidad (50%), seguida por Junín (34,62%), mientras que en Cajamarca se encuentra un menor porcentaje de variabilidad (28,85%, Tabla 10). Los valores de número efectivo de alelos ( $N_e$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) e índice de Shannon ( $I$ ) también son mayores en la población de Ayacucho, seguidos por los de Junín y Cajamarca, lo cual indica el grado de diversidad genética de dichas poblaciones. Nagl *et al.* (2 011) estudiaron la variabilidad en diferentes variedades de la leguminosa *Medicago sativa* (alfalfa), encontrando una gran diversidad genética, al obtener valores altos de  $H_e$  e  $I$  iguales a  $0,256 \pm 0,208$  y  $0,375 \pm 0,292$  respectivamente en la variedad Zuzana, los cuales son próximos a los valores correspondientes hallados en la población de Ayacucho al analizar los *loci* polimórficos (Tabla 11). Aparajita (2 009) al estudiar la diversidad genética de 8 poblaciones de *Albizia lebbbeck* (fabaceae) mediante marcadores RAPD e ISSR, encontró valores de  $N_e$  en el rango de 1,23 a 1,38,  $H_e$  en el rango de 0,12 a 0,21 e  $I$  entre 0,19 y 0,32, concluyendo en la presencia de una diversidad genética amplia y diferente en cada población. Los resultado de  $N_e$ ,  $H_e$  e  $I$  de nuestro estudio se encuentran dentro del rango encontrado por Aparajita, con valores cercanos a los límites inferiores en Cajamarca y valores cercanos a los límites superiores en Ayacucho (Tabla 10): estos resultados muestran la amplia variabilidad genética de *C. spinosa* que puede hallarse en las poblaciones peruanas.

### 6.2.1 Análisis de agrupamiento (clusters)

Ulloa *et al.* (2 003) señalan que la construcción de dendogramas es un medio efectivo de cuantificación de patrones en distancias genéticas entre individuos cercanos, y que lo dendogramas basados en el método UPGMA poseen ventajas sobre muchos otros métodos. UPGMA es el más simple de los métodos de distancia o métodos de matriz de distancia (Nei *et al.*, 2 000) y asume que la proporción evolutiva entre todas las ramas del árbol sea más o menos la misma (Valadez *et al.*, 2 000). El método UPGMA, basado en la matriz de distancia de Jaccard, es muy utilizado para el análisis de agrupamiento de individuos de una misma especie y ha sido empleado para el análisis de diversidad genética mediante marcadores moleculares RAPDs de múltiples familias de plantas, incluyendo especies de la familia Fabaceae como *Medicago sativa*, *Vigna subterranea* y *Stylosanthes guianensis* (Nagl *et al.*, 2011; Rungnoi *et al.*, 2 012; Tieko *et al.*, 2 013, respectivamente). Según estos antecedentes, se optó por utilizar dicho método para visualizar el agrupamiento de individuos de *C. spinosa* procedentes de las poblaciones de Cajamarca, Junín y Ayacucho. El análisis muestra la presencia de 3 grupos, nombrados con las letras A, B y C, soportados con valores altos de *bootstrap*, exceptuando el nodo que separa los grupos A y B que posee un valor de 36; sin embargo, se ha observado en otros estudios con marcadores RAPD que valores de *bootstrap* menores que éste pueden brindar información del agrupamiento genético de los individuos de una especie, si son interpretados con precaución (Ebrahimi *et al.*, 2 009; Sarkhosh *et al.*, 2 009). El dendograma permite observar que los individuos agrupados por similitud genética tienden a pertenecer a una misma región geográfica. La presencia del individuo ayacuchano T12 en el grupo B, grupo conformado en su mayoría por individuos de Cajamarca, puede ser tomada como evidencia de la presencia de linajes más antiguos en Cajamarca, que en determinado momento pudieron dar origen a linajes de Ayacucho, de acuerdo con la interpretación que hacen Nagl *et al.* (2 011) al estudiar la diversidad genética de

variedades de alfalfa. Tal inferencia supone, a la vez, que en determinado momento de la historia debió existir un flujo génico entre las poblaciones de Cajamarca y Ayacucho, a pesar de estar tan distanciadas (747 km, aprox.). Al respecto, un estudio de diversidad genética mediante análisis de ADN cloroplastidial de poblaciones de *C. spinosa*, realizado por Balaguer *et al.* (2011) en diversas regiones geográficas de Perú, encontró que las poblaciones muestreadas dentro de los límites del Imperio Inca comparten un haplotipo, y señalan que este patrón, similar al de otras plantas neotropicales de importancia económica, sería atribuido al efecto de la antigua actividad comercial de los agricultores precolombinos, quienes habrían movilizado las semillas de tara entre regiones distantes del Perú, debido a que esta planta fue también de gran uso e importancia económica en esas épocas. Además, Balaguer *et al.* hallaron una mayor diversidad genética en la provincia de San Marcos (Cajamarca), donde se registraron 4 haplotipos. Estos resultados no coinciden con los hallados en el presente estudio; sin embargo, en el estudio de Balaguer se observa que el “haplotipo D” está presente solo en poblaciones del norte (San Marcos - Cajamarca) y el sur (Santa Ana – Ayacucho, Chalhuanca-Soraya - Apurímac) del Perú, lo cual implica el flujo génico entre estas zonas distantes y coincide con lo hallado en esta investigación. Estos resultados permiten sugerir un estudio de diversidad más exhaustivo entre las poblaciones de Cajamarca y Ayacucho, para entender la dinámica del flujo génico que existe o existió entre estas zonas, lo cual permitiría entender mucho mejor la distribución de la diversidad genética de la tara.

#### 6.2.2 Análisis de estructura genética poblacional

La diversidad entre poblaciones es estimada generalmente con AMOVA ( $\phi_{ST}$ ) en estudios basados en marcadores dominantes (Nyboer, 2004). El estadístico  $F_{ST}$ , equivalente a  $\phi_{ST}$  (Excoffier *et al.*, 1992), también llamado índice de fijación, es el efecto de la subdivisión poblacional debido a la endogamia; valores bajos, cercanos a cero, indican altas tasas de



flujo génico entre los fragmentos poblacionales, mientras que valores altos de  $F_{ST}$ , cercanos a 1, indican tasas bajas de flujo génico. Los valores obtenidos de  $\phi_{ST}$  a pares entre las 3 poblaciones de *C. spinosa* se ubican dentro del rango de 0.34 a 0.40 (Tabla 12), lo cual indica una diferenciación genética significativa (Frankham *et al.*, 2 002). Los resultados de  $\phi_{ST}$  obtenidos muestran diferencias significativas entre las poblaciones, los cuales son similares a los hallados en poblaciones de *Caesalpinia echinata* (Cardoso *et al.*, 1 998) analizadas con marcadores RAPD.

Los resultados de AMOVA entre las 3 poblaciones muestreadas señalan que la variación genética intrapoblacional abarca el mayor porcentaje (60.84%) de la variación total. En estudios realizados en *Caesalpinia echinata* (Cardoso *et al.*, 1 998) se encontró que la variabilidad intrapoblacional explica un 42% de la variabilidad total, siendo este un valor relativamente bajo en comparación con otras especies exogámicas. El resultado de variabilidad intrapoblacional del presente estudio, al mostrar un valor mucho más alto, estaría acorde con los resultados hallados en especies exogámicas, lo que implica un alto flujo génico entre individuos de la misma población y está acorde con las descripciones que hace Borges *et al.* sobre los sistemas reproductivos en *Caesalpinia* s.l.

### **6.3 Conservación**

La tara ha sido y sigue siendo una especie de importancia económica debido a los múltiples usos que posee, sobre todo, a partir de sus frutos. En ese sentido, debe ser considerada un recurso genético sobre el cual deben focalizarse programas adecuados de conservación. Para el diseño de un correcto sistema de conservación para esta especie, debe considerarse la dinámica de sus poblaciones, sus aspectos ecológicos, reproductivos, fisiológicos y genéticos (Pezoa, 2 001). El presente estudio contribuye al conocimiento de las características genéticas y poblacionales de *C. spinosa*, a partir de

característica fenotípicas y moleculares de ADN. La diversidad genética mediante caracteres morfológicos del fruto ha mostrado una amplia variabilidad en las tres poblaciones, la cual se debería sobre todo a su interacción con el medio ambiente, epistasis o algún otro mecanismo de control genético desconocido (Kesari *et al.*, 2011). Por otro lado, los marcadores moleculares RAPD son independientes de los efectos ambientales y poseen gran polimorfismo (Ebrahimi *et al.*, 2009), por lo cual son mucho más eficientes para la determinación de la estructura genética poblacional en comparación con los marcadores morfológicos.

Las 3 poblaciones muestreadas se encuentran diferenciadas genéticamente y poseen niveles altos de diversidad genética: las poblaciones de Ayacucho y Junín presentan los mayores valores de diversidad; no obstante, en la primera se han hallado plantas con una mayor frecuencia de características frutales deseables, lo que podría estar indicando la presencia de un ambiente más adecuado para el desarrollo óptimo de la planta. Basándonos en las recomendaciones de Nagl *et al.* (2011), las poblaciones de Ayacucho y Junín podrían ser usadas como fuente de selección de germoplasma deseable, debido a que tiene los más altos índices de diversidad genética, mientras que la población de Cajamarca, por mostrar menor variabilidad (mayor homogeneidad), podría ser utilizada como fuente de parentales para programas de semi-hibridaciones, con el fin de obtener progenies híbridas heterocigotas.

Para poder realizar dichas tareas, será necesario establecer estrategias de conservación, tanto *ex situ* como *in situ* con la participación de las comunidades locales, ya que estas poseen dominio sobre los territorios y conocimientos ancestrales en torno al uso y manejo de este recurso (Pezoa, 2001). Siendo así, los programas de conservación, manejo y reforestación de la especie deberán ser cuidadosos para no propiciar un flujo génico entre acervos distintos, conservar los genes locales que podrían estar confiriendo una mayor

adaptación a ciertas condiciones ambientales e impedir la erosión genética de la especie en el país (Narváez *et al.*, 2 009).

## 7. CONCLUSIONES

- i. Los marcadores moleculares RAPD obtenidos en este estudio permitieron evaluar adecuadamente la diversidad genética de las poblaciones de tara de Junín, Ayacucho y Cajamarca.
- ii. Las estimaciones de  $N_e$ ,  $H_e$  e  $I$  indican que la población con mayor diversidad genética es la de Ayacucho.
- iii. A partir de los análisis multivariantes (ACP y AFDC) de los marcadores morfométricos de frutos se logró establecer diferencias fenotípicas moderadas entre las poblaciones de Ayacucho, Junín y Cajamarca.
- iv. No existe una relación directa entre la variabilidad o diversidad genética intrapoblacional hallada mediante los análisis morfométricos y los análisis moleculares.
- v. Desde el punto de vista productivo y económico, la población de Ayacucho posee la mayor cantidad de características deseables.

## 8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de diversidad genética en un mayor número de poblaciones silvestres de *Caesalpinia spinosa* en el territorio peruano, para así acercarnos aún más al conocimiento de la distribución de la diversidad genética de esta especie.
- Sería conveniente realizar estudios de influencia de factores ambientales en el fenotipo de la tara, puesto que ayudaría a comprender el rol de las características genotípicas en su adaptación a los diversos ambientes.
- El conocimiento del genoma de la tara ayudaría a realizar estudios de diversidad genética más minuciosos, por lo que es de gran importancia iniciar con proyectos de secuenciamiento de ADN de esta importante especie.
- Puesto que se evidencia una amplia variabilidad genética en las poblaciones de *C. spinosa*, sería necesario iniciar programas de manejo basados en el conocimiento que se viene generando, enfatizando en la interacción entre los gobiernos y las comunidades productoras, de modo que se logre el aprovechamiento eficiente y sostenible de este recurso.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARAJITA, S.; ROUT, G. 2009. Genetic differentiation of *Albizia lebbeck* (L.) Benth. populations estimated by RAPD and ISSR markers. *Plant Biosystems*. Vol. 143, nº 2, p. 361-368.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Vol. 161, p. 105-121.
- AZOFEITA-DELGADO, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*. Vol. 17, nº 2, p. 221-242.
- BALAGUER, L.; ARROYO-GARCÍA, R.; JIMÉNEZ, P.; JIMÉNEZ, M.; VILLEGAS, L.; CORDERO, I.; RUBIO, R.; FERNÁNDEZ-DELGADO, R.; RON, M.; MANRIQUE, E.; VARGAS, P.; CANO, E.; PUEYO, J.; ARONSON, J. 2011. Forest Restoration in a Fog Oasis: Evidence Indicates Need for Cultural Awareness in Constructing the Reference. *PLos One*. Vol. 6, issue 8, e23004.
- BANSAL, D.; BHASIN, P.; YADAV, O.; PUNIA, A. 2012. Assessment of genetic diversity in *Lepidium sativum* (Chandrasur) a medicinal herb used in folklore remedies in India using RAPD. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. Vol. 10, p. 39-45.
- BORGES, L.; SOBRINHO, M.; LOPES, A. 2009. Phenology, pollination and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. *Flora*. Vol. 204, p. 111-130.

- CABRERO, J.; CAMACHO, J. Fundamentos de Genética de Poblaciones. En SOLER, M. *Evolución: la base de la Biología*. Granada: Proyecto Sur de Ediciones, 2002. Capítulo 6, p. 83-126. ISBN: 84-8254-139-0.
- CAMPOS, D. *Obtención y caracterización de taninos hidrolizados de tara (Caesalpinia spinosa) y evaluación de su eficacia antioxidante en carnes y aceites vegetales*. Lima: Perúbiodiverso, 2010. 78 p.
- CARDOSO, M.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRAS, P.; DE OLIVEIRA, D. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Molecular Ecology*. Vol. 7, p. 601-608.
- CASTAÑEDA, D.; POMBO, L.; URUEÑA, C.; HERNANDEZ, J.; FIORENTINO, S. 2012. A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 12, n° 38, p. 1-10.
- CASTELL ESCUER, Joan Carles. "Tara (*Caesalpinia spinosa*): The sustainable source of tannins for innovative tanning processes". Asesores: Anna Bacardit, Lluís Ollé. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña (UPC), Departamento de Ingeniería de Proyectos, Barcelona, 2012.
- CASTELL, J.; FABREGAT, C.; SOROLLA, S.; JORBA, M.; BACARTIT, A.; OLLÉ, L. 2012. *Caesalpinia spinosa* (tara): La fuente sostenible de taninos. *Journal of Aqeic*. Vol. 63, n° 2, p. 21-30.
- DOSTERT, N.; ROQUE, J.; BROKAMP, G.; CANO, A.; LA TORRE, M.; WEIGEND, M. Factsheet: Datos botánicos de Tara. 1ra ed. Lima: Deutsche Gesellschaft für

Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH: Programa Desarrollo Rural Sostenible – PDRS, 2009. 9 p.

- EBRAHIMI, R.; ZAMANI, Z.; KASHI, A. 2009. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*. Vol. 119, p. 345-351.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. 2011. ARLEQUIN Version 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Ecology and Evolution, University of Berne, Switzerland.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. Vol. 131, p. 479-491.
- FAIRBANKS, D.; ANDERSEN, W. *Molecular Analysis of Genetic Diversity: Advantages and Limitations*. En: Proceedings: Wildland shrub and arid land restoration symposium. Las Vegas: NV. Gen. Tech., 1993.
- FONTANETTI, M.; BACHIN, R.; FERNANDES, K.; DE CÁSSIA, M.; APPARECIDA, J. 2012. Characterization of the genetic variability among *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. (Fabaceae) plants using RAPD molecular markers. *Acta Scientiarum*. Vol. 34, n° 3, p. 259-263.
- FRANCO, T.; HIDALGO, R. *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Cali: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), 2003. 89p. ISBN: 92-9043-543-7.



- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.; BRISCOE, D. *Introduction to Conservation Genetics*. New York: Cambridge University Press, 2002. 617 p. ISBN: 978-0-521-63985-9.
- GAGNON, E.; LEWIS, G.; SOTUYO, J.; HUGHES, C.; BRUNEAU, A. 2013. A molecular phylogeny of *Caesalpinia* sensu lato: Increased sampling reveals new insights and more genera than expected. *South African Journal of Botany*. Vol. 89, p. 111-127.
- GE, J.; SUN, M. 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology*. Vol. 8, p. 2061-2069.
- KESARI, V.; RANGAN, L. 2011. Genetic diversity analysis by RAPD markers in candidate plus trees of *Pongamia pinnata*, a promising source of bioenergy. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 35, p. 3123-3128.
- KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA, L. 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 99, p.309-312.
- LARREA, M. *Tara, guarango o taya (Caesalpinia spinosa) en la Región (Ecuador, Perú y Bolivia): Criterios ambientales para su aprovechamiento y manejo sustentables*. Secretaría General de la Comunidad Andina, Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION, 2010. 41 p.
- LEWIS, G.; GIBBS, P. 1999. Reproductive biology of *Caesalpinia calycina* and *C. pluviosa* (Leguminosae) of the caatinga of north-eastern Brazil. *Pl. Syst. Evol.* Vol. 217, p. 43-53.

- LÓPEZ, A.; ORÉ, R.; MIRANDA C.; TRABUCCO, J.; ORIHUELA D.; LINARES J.; VILLAFANI Y.; RÍOS S.; SILES M. 2011. Capacidad antioxidante de poblaciones silvestres de “tara” (*Caesalpinia spinosa*) de las localidades de Picoy y Santa Fe (Provincia de Tarma, departamento de Junín). *Scientia Agropecuaria*. Vol. 2, p. 25-29.
- LÓPEZ, A.; SILES-VALLEJOS, M.; ORIHUELA, D.; LINARES, J.; RÍOS, S.; VILLAFANI, Y.; GUEVARA, M.; BRACAMONTE, O. 2014. Caracterización citogenética de *Caesalpinia spinosa* de los distritos de Tarma y Palca (Junín). *Rev. peru. biol.* Vol. 20, n° 3, p. 245-248.
- MANCERO, L. *La Tara (Caesalpinia spinosa) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región*. Quito: Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION, 2009. 103 p. Serie Investigación y Sistematización No. 2.
- MORENO-VÁZQUEZ, S. Análisis de resultados en la caracterización molecular. En: GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; PITA J. *Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos*. Valladolid: Publicaciones I.N.E.A. 2001. P. 263-275.
- MUTHUSAMY, S.; KANAGARAJAN, S.; PONNUSAMY, S. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 11, n° 3, p. 1-10.
- NAGL, N.; TASKI-AJDUKOVIC, K.; BARAC, G.; BABURSKI, A.; SECCARECCIA, I.; MILIC, D.; KATIC, S. 2011. Estimation of the Genetic Diversity in Tetraploid Alfalfa Populations Based on RAPD Markers for Breeding Purposes. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 12, p. 5449-5460.
- NARVÁEZ, A.; CALVO, A.; TROYA, A. *Las poblaciones naturales de la tara (Caesalpinia spinosa) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la*

*diversidad genética y el contenido de taninos a través de estudios moleculares y bioquímicos*. Quito: Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION, Laboratorio de Biotecnología Vegetal Escuela de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE, 2009. 39 p. Serie Investigación y Sistematización No. 7. ISBN: 978-9942-.

- NEI, M.; KUMAR, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press, 2000. 328 p. ISBN: 0-19-513584-9.
- NEWTON, A.; ALLNUTT, T.; GILLIES, A.; LOWE, A.; ENNOS, R. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Tree*. Vol. 14, n° 4, p. 140-145.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*. Vol. 13, p. 1143-1155.
- OGATA GUTIÉRREZ, Katty. "Diversidad de microorganismos en la rizósfera de "tara" (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze) y su efecto en el crecimiento del cultivo". Tesis Título Profesional. UNALM, Facultad de Ciencias, Lima, 2006.
- PAVLICEK, A.; HRDA, S.; FLEGR, J. 1999. Free Tree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol*. Vol. 45, p. 97-99.
- PEÑA, D. *Análisis de datos multivariantes*. 1ra edición. McGraw Hill, 2002. ISBN: 8448136101.
- PERÚBIODIVERSO. *La cadena de valor de la tara en la región Cajamarca*. 1ra ed. Lima: Cooperación Alemana al Desarrollo – Agencia de la GIZ en el Perú, 2013. 72 p.

- PEZOA, A. Estrategias de Conservación de la Diversidad Biológica. En: F.A. Squeo, G. Arancio y J.R. Gutiérrez, Eds. *Libro Rojo de la Flora Nativa y de los Sitios Prioritarios para su Conservación: Región de Coquimbo*. La Serena: Ediciones Universidad de La Serena, 2001. P. 273-280.
- PORTAL, E. 2010. Distribución altitudinal y elaboración de clave dicotómica y pictórica de biotipos de tara (*Caesalpinia spinosa*). Huamanga, Ayacucho. *Biologica Huamangensis*. Vol.1, n° 1, p. 1-5.
- PROFOUND – ADVISERS IN DEVELOPMENT. Estudio de Mercado: Tara (*Caesalpinia spinosa*). Lima: Swiss Import Promotion Programme. 2008. 48 p.
- RAMBAUT, A. 2012. FigTree: TreeFigure Drawing Tool Version 1.4.0. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponible en Web: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- RAO, V.; HODGKIN, T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 68, p. 1-19.
- ROJAS, N.; AVILÉS, R.; VILLACAQUI, E.; NEIRA, E.; RAMOS, W.; SANTIAGO, J. 2011. Tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma que contienen extracto hidroalcohólico de tara (*Caesalpinia spinosa*) en animales de experimentación. *Dermatología Peruana*. Vol. 21 (I), p. 6-12.
- RUNGNOI, O.; SUWANPRASERT, J.; SOMTA, P.; SRINIVES, P. 2012. Molecular genetic diversity of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc.) revealed by RAPD and ISSR marker analysis. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*. Vol. 44, n° 1, p. 87-101.

- SARKHOSH, A.; ZAMANI, Z.; FATAHI, R.; RANJBAR, H. 2009. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*. Vol. 121, p. 313-319.
- SEDAPAL. *Ecología del Perú*. Lima: Adobe Editores S.A., 2000. 236 p.
- TIEKO, E.; CHIARI, L.; SIMEAO, R.; DÓMELAS, C.; GAMARRA, E.; PAZINATO, D. 2013. Genetic variability of accessions of 'BRS Bela' cultivar of *Stylosanthes guianensis* using RAPD markers. *Ciencia Rural*. Vol. 43, n° 1, p. 114-119.
- TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. [ref. del 04 de mayo del 2014]. Disponible en Web: <http://www.tropicos.org>
- ULLOA, O.; ORTEGA, F.; CAMPOS, H. 2003. Analysis of genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) breeding populations as revealed by RAPD genetic markers. *Genome*. Vol. 46, p. 529-535.
- VALADEZ, E.; KAHL, G. Huellas de ADN en genomas de plantas. México D.F.: Mundi-Prensa México, 2000. 147 p. ISBN: 968-7462-22-1.
- VILLANUEVA, C. *La tara el oro verde de los Incas*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2007. 163 p. ISBN: 978-9972-9456-8-7.
- WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, J.; TINGEY, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. Vol. 18, No. 22, p. 6531-6535.
- YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T. 1999. POPGENE version 1.31: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta y Centre for International Forestry Research.

- YONEMOTO, Y.; CHOWDHURY, A.; KATO, H.; MACHA, M.; OKUDA, H. 2007. Characterization of white sapote (*Casimiroa edulis* Llave & Lex.) germplasm using floral morphology, RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*. Vol. 112, p. 366-375.
- ZHENG, D.; LIANG, Y.; LIU, G.; YAN, D.; LINGHU, C.; TIAN, Y. 2009. RAPD Analysis of Germplasm Resources of Kudingcha Species in Oleaceae. *Agricultural Sciences in China*. Vol. 8, n° 7, p. 784-792.